

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2018

Bc. Kristýna Žáčková



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ TECHNICKÉHO KONOPÍ DO KOSMETIKY PROTI  
AKNĚ**

USE OF TECHNICAL HEMP IN ACNE PREPARATIONS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Kristýna Žáčková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**

**BRNO 2018**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1159/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Kristýna Žáčková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Využití technického konopí do kosmetiky proti akné

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) vypracování literární rešerše shrnující aktuální informace o aktivních látkách používaných v přípravcích proti akné, včetně nároků na výběr správného kosmetického vehikula pro lepší biologickou dostupnost účinné látky
- 2) stanovení a charakterizace aktivních látek z vybraných částí rostliny konopí
- 3) návrh a testování vybraných kosmetických výrobků proti akné s obsahem aktivních látek z konopí

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Kristýna Žáčková  
student(ka)

-----  
Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Konopí patří mezi významné rostliny s dlouhou průmyslovou tradicí. Jeho první využití však bylo původně v léčitelství. V medicíně se uplatňuje především díky obsahu mnoha biologicky aktivních látek, jako jsou kanabinoidy. Tato práce se zabývá využitím konopí v kosmetice proti akné. V teoretické části je pozornost zaměřena především na charakterizaci konopí a jeho aktivní látky. Další kapitoly se pak věnují kosmetickým přípravkům a samotnému akné, tedy i bakterii *Propionibacterium acnes*, která se podílí na jeho průběhu. V rámci experimentální části byly charakterizovány extrakty dvou odrůd konopí setého (Finola a Bialobřežské) z hlediska přítomnosti antioxidantů a kanabinoidů. Dále byly připraveny kosmetické přípravky s obsahem konopných extraktů zahrnující kompletní čistící řadu pro aknézní pleť, zároveň byly pořízeny i podobné komerční produkty. U kosmetických přípravků a extraktů byl sledován jejich inhibiční účinek proti *Propionibacterium acnes*. Dále byl testován i *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*. Z dosažených výsledků plyne, že extrakty sušeného konopného květu obsahují největší množství účinných látek, mají tedy i vyšší antioxidační a antimikrobiální účinek. Výskyt jednotlivých kanabinoidů se lišil především v závislosti na odrůdě. Všechny konopné extrakty působily proti grampozitivním bakteriím, u kosmetických přípravků byl účinek již nižší. Nicméně bylo prokázáno, že konopí má antibakteriální účinek.

## ABSTRACT

Hemp belongs among important plants with a long industrial tradition. However, its first use was originally for healing. In medicine, it is mainly applied thanks to the content of many biologically active substances, such as cannabinoids. This thesis is concerned with the use of hemp in acne preparations. The theory focuses mainly on the characterization of hemp and its active substances. The other chapters deals with cosmetic preparations and acne itself, and *Propionibacterium acnes* as well, which is involved. Within the experimental part, the extracts of two hemp varieties (Finola and Bialobrzezkie) were characterized in terms of antioxidant and cannabinoid presence. The cosmetic preparations with hemp extract content were prepared including a complete cleansing set for acne skin, concurrently commercial products of this sort were purchased. In cosmetic preparations and the extracts their inhibitory effect against *Propionibacterium acnes* was studied as well. Also *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and *Candida glabrata* were tested. The results show that dried hemp flower extracts contain the greatest amount of active substances, so they have a higher antioxidant and antimicrobial effect. The presence of individual cannabinoids differed mainly depending on the variety. All hemp extracts had effect against gram-positive bacteria, in cosmetic preparations it was lower. Nevertheless hemp antibacterial effect has been proven.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Technické konopí, akné, kanabinoidy, *Propionibacterium acnes*, kosmetické přípravky

## KEYWORDS

Hemp, acne, cannabinoids, *Propionibacterium acnes*, cosmetic products

ŽÁČKOVÁ, K. *Využití technického konopí do kosmetiky proti akné*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 80 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Ing. Andrei Háronikové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům za pomoc a ochotu v průběhu mé práce. Velký dík patří i mé rodině za jejich trpělivost a podporu.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1	Konopí.....	9
2.1.1	Historie a současnost .....	9
2.1.2	Legislativa .....	9
2.1.3	Charakteristika rostliny .....	9
2.1.4	Odrůdy konopí.....	11
2.2	Biologicky účinné metabolity konopí .....	11
2.2.1	Kanabinoidy .....	11
2.2.2	Terpeny .....	13
2.2.3	Flavonoidy .....	13
2.2.4	Stilbeny .....	13
2.3	Využití konopí.....	13
2.3.1	Technické konopí .....	14
2.3.2	Lékařské konopí .....	14
2.4	<i>Propionibacterium acnes</i> .....	15
2.4.1	Charakteristika bakterie .....	15
2.4.2	Metabolismus .....	16
2.4.3	Bakteriální lipáza .....	16
2.4.4	Tvorba biofilmu .....	17
2.4.5	Onemocnění spojená s <i>Propionibacterium acnes</i> .....	17
2.5	Akné .....	18
2.5.1	Faktory ovlivňující akné .....	18
2.5.2	Vznik a průběh akné .....	19
2.5.3	Léčba akné .....	20
2.5.4	Vliv aktivních látek konopí na akné .....	21
2.6	Stavba kůže.....	22
2.6.1	Lipidová bariéra.....	22
2.6.2	Pokožka ( <i>epidermis</i> ) .....	22
2.6.3	Škára ( <i>dermis</i> ) .....	23
2.6.4	Podkožní tkáň ( <i>tela subcutanea</i> ) .....	23

2.7	Kosmetické přípravky .....	24
2.7.1	Základní složky .....	24
2.7.2	Klasifikace kosmetických přípravků .....	26
2.7.3	Volba kosmetického vehikula .....	27
2.7.4	Mechanismus účinku .....	29
2.7.5	Formulace kosmetických přípravků .....	30
2.8	Metody analýzy kosmetických přípravků .....	31
2.8.1	Analytické instrumentální metody .....	31
2.8.2	Antimikrobiální testy .....	32
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
4.1	Použité chemikálie a přístroje .....	34
4.1.1	Chemikálie.....	34
4.1.2	Přístroje.....	35
4.2	Použité mikroorganismy.....	35
4.3	Použité odrůdy konopí.....	36
4.4	Příprava konopných vzorků.....	36
4.4.1	Extrakty .....	37
4.4.2	Pleťové mléko.....	38
4.4.3	Micelární voda.....	38
4.4.4	Pleťové tonikum .....	39
4.4.5	Zakoupené konopné přípravky .....	39
4.5	Stanovení celkových polyfenolů .....	40
4.6	Stanovení celkových flavonoidů .....	40
4.7	Stanovení antioxidační aktivity .....	40
4.8	Stanovení kanabinoidů pomocí HPLC .....	41
4.9	Stanovení antimikrobiálního účinku .....	42
4.9.1	Difúzní agarový test.....	42
4.9.2	Diluční jamkový test.....	42

<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>43</b>
5.1	Připravené konopné vzorky .....	43
5.1.1	Konopný extrakt .....	43
5.1.2	Pleťové mléko.....	43
5.1.3	Micelární voda.....	43
5.1.4	Pleťové tonikum .....	43
5.2	Celkové polyfenoly .....	44
5.2.1	Extrakty .....	44
5.2.2	Kosmetické přípravky.....	46
5.3	Celkové flavonoidy .....	47
5.3.1	Extrakty .....	47
5.3.2	Kosmetické přípravky.....	49
5.4	Antioxidační aktivita .....	50
5.4.1	Extrakty .....	50
5.4.2	Kosmetické přípravky.....	51
5.5	Obsah kanabinoidů .....	53
5.5.1	Vývoj metody .....	53
5.5.2	Stanovení pracovního rozsahu a linearity kalibrace .....	55
5.5.3	Kvalitativní charakteristiky kanabinoidů.....	56
5.5.4	Stanovené množství v extraktech .....	58
5.6	Antimikrobiální aktivita .....	61
5.6.1	Grampozitivní bakterie .....	61
5.6.2	Gramnegativní bakterie .....	69
5.6.3	Kvasinky .....	69
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>78</b>



# 1 ÚVOD

Konopí se řadí mezi tradiční rostliny díky dlouholetému využívání, které sahá až několik tisíc let zpět do oblasti střední Asie. Nachází uplatnění nejen jako průmyslový materiál, ale vzhledem k přítomnosti mnoha aktivních látek má také veliký potenciál ve farmacii a kosmetice. V minulosti se konopí běžně využívalo v mnoha průmyslových odvětvích, jako je například papírenský, textilní a stavební průmysl. Konopí se také pěstovalo pro léčebné účinky, spíše však jako součást tradiční východní medicíny.

V dnešní době se konopí nevyužívá tak jako v minulosti a mnozí lidé si pod pojmem konopí představí pouze drogu. Je ovšem důležité rozlišovat konopí medicínské a technické. Tyto dva druhy se liší obsahem psychoaktivního THC –  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu, což je nejznámější zástupce kanabinoidů, látek přítomných pouze v konopí. Především tato skupina látek, ale také další biologicky aktivní látky, jako jsou třeba terpeny, antioxidanty a vitamíny, jsou důvodem, proč má konopí potenciál právě v kosmetice a farmacii.

*Propionibacterium acnes* je grampozitivní bakterie, která se podílí na rozvoji akné. Toto kožní onemocnění postihne převážnou většinu lidstva alespoň jednou za život. Existuje mnoho možností léčby, přičemž jednou z nich je i využití kosmetických produktů s obsahem konopí. Na trhu se stále častěji můžeme setkávat s kosmetickými přípravky obsahující především konopný olej nebo konopný extrakt.

Předložená práce je zaměřena na technické konopí z hlediska přítomných aktivních látek a jeho aplikace v kosmetických produktech proti akné. Podrobněji se však také zabývá samotným onemocněním a s tím spojenou *Propionibacterium acnes*. Dále jsou v teoretické části popsány složky kosmetických přípravků, možnosti výběru a přípravy kosmetických vehikul. Všechny uvedené informace jsou pak spojeny v rámci experimentální části, ve které byly připraveny různé kosmetické přípravky určené pro péči o aknézní pleť. Tyto produkty obsahovaly konopný extrakt dvou různých odrůd konopí setého (Finola, Bialobřežské). U kosmetických přípravků a extraktů pak byla stanovena jejich antimikrobiální aktivita. Součástí práce byla také základní analýza připravených konopných extraktů z hlediska účinných látek, jako jsou antioxidanty a kanabinoidy.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Konopí

Konopí je významná rostlina, která byla v minulosti běžně využívána v nejrůznějších oblastech. Po odluce minulého století začíná být opět pěstována a studována, což přispívá k vývoji zejména v oblasti zemědělství a životního prostředí, ale také z hlediska léčebných účinků. Tato jednoletá rostlina tak nachází všestranné využití [1].

#### 2.1.1 Historie a současnost

Historie konopí se datuje již několik tisíc let před Kristem, kdy bylo zřejmě v Číně pěstováno především kvůli vlákně, hlavně pro výrobu papíru, textilu a lan. Indové pak přibližně v 9. století před Kristem objevili i jeho léčebné účinky. V Evropě se konopí začalo pěstovat už před 5. stoletím před Kristem, což je zaznamenáno v díle řeckého historika Herodota. Poté se rozšířilo i do Afriky a po osídlení Ameriky i tam. V 18. století po Kristu sloužilo konopí především jako průmyslový materiál na výrobu papíru a oblečení, zmiňováno je i v lékařských knihách. Ve 2. polovině 20. století se vytrácí zájem o využití konopí v lékařství a vzhledem k průmyslovému pokroku i v jednotlivých hospodářských oblastech [2], [3], [4].

V posledních letech dochází k obnově pěstování konopí nejen v České republice, ale i v dalších zemích světa. Dnes je konopí atraktivní ekologickou a přírodní surovinou, která se využívá hlavně ve stavebním, papírenském a automobilovém průmyslu. I v České republice se od nového tisíciletí zvyšuje počet producentů konopí setého. Zároveň je také vedeno mnoho výzkumných činností [3], [4].

#### 2.1.2 Legislativa

Společnost často nevidí a nezná rozdíl mezi druhy konopí a mylně se tak domnívá, že se jedná o jediný druh, který bývá někdy zneužíván. Pro tento účel, ale především pro využití v medicíně se zmiňovaný druh označuje jako lékařské konopí. Naproti tomu v zemědělství a průmyslu se velmi často setkáváme s pojmem technické konopí. Rozdíl mezi jmenovanými druhy konopí je pouze v obsahu  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu (THC), což je zástupce skupiny látek známých jako kanabinoidy. Tyto sloučeniny se vyskytují pouze v konopí a díky jejich účinkům, ale také jiným biologicky aktivním látkám, může být tato rostlina využívána pro medicínské účely [5].

Technické konopí je vyšlechtěná odrůda s nízkým obsahem THC, zatímco v lékařském konopí je jeho obsah zpravidla vyšší. Toto množství je dáno zákonem. V České republice je platný zákon č. 167/1998 Sb., kde § 24a zakazuje pěstovat odrůdy konopí s obsahem THC vyšším než 0,3 %. Dle § 29 lze pěstovat konopí do celkové plochy 100 metrů čtverečních bez ohlášení, s povolením k získávání, skladování a zpracování konopí k účelům průmyslovým a pokusnickým na základě § 5 [5], [6].

#### 2.1.3 Charakteristika rostliny

Klasifikace konopí z botanického hlediska nejsou zcela jednoznačné a mohou se rozcházet. Je to však jednoletá cévnatá rostlina, která se řadí do čeledi konopovité. Je velmi dobře přizpůsobitelná rozmanitým přírodním podmínkám, a proto se s konopím můžeme setkat prakticky ve všech podnebných pásmech [7], [8].

Jako rostlina je charakteristicky tmavě zelená a z morfologické stránky se skládá z několika částí. V první řadě jsou to květy produkující pryskyřici, která je tvořena mnoha biologicky účinnými látkami, především kanabinoidy. Konopí je původně dvoudomá rostlina, takže rozlišujeme samčí a samičí rostliny (viz Obr. 1). Květy samčích a samičích rostlin se liší v několika aspektech, jako je například doba kvetení a vzhled. V samičích květech také dozrávají malá semena. Dále jsou pro konopí typické pilovité několikačetné listy a dutý stonek s velmi pevným lýkovým vláknem. Kořen konopí je kulovitého tvaru a jeho délka se může lišit na základě typu půdy [8].



Obr. 1: Konopí seté [1] – upraveno

Z funkčního hlediska můžeme konopí rozdělit do čtyř skupin. První z nich je divoké konopí, které lze nalézt volně v přírodě a není nijak zasaženo lidským faktorem. Další tři skupiny jsou již šlechtěné rostliny z různých důvodů – pro vlákno, olejnatá semena a jako psychoaktivní rostlina. Konopí pěstované kvůli vláknu nachází uplatnění například v textilním průmyslu, pro semena pak například v potravinářství. Poslední jmenovaná skupina bývá často nezákonně zneužívána, ovšem využití nachází i v medicíně [7].

Obecně známé jsou především druhy konopí setého, indického a rumištního. Šlechtěním konopí setého vznikly další specifické typy konopí jako je konopí severní, středoruské, jižní a středoevropské. Konopí seté, indické a rumištní se od sebe liší morfologií, původní oblastí výskytu, vegetační dobou, využitím, ale především obsahem jednotlivých zástupců kanabinoidů. Pro průmyslové účely je nejčastěji využíváno konopí seté (*Cannabis sativa*), které je díky tomu dnes často označováno jako technické konopí a je zároveň nejrozšířenějším druhem konopí [3], [8].

### 2.1.4 Odrůdy konopí

Ze základních druhů konopí bylo postupem času vyšlechtěno mnoho specifických odrůd, přičemž v České republice je dle Společného katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin povoleno pěstovat 51 odrůd konopí setého [9].

Finola pochází z Finska a je považována za ranou odrůdu. Nejčastěji je pěstována pro semena, jelikož je jejich výnos vysoký. Pro dobrou úrodu jsou důležité klimatické podmínky a půda, dorůstá pouze do výšky 1,5 m. Doba dozrávání Finoly je 90 dní, přičemž je ideálně sklízet během léta. V rámci nedávné studie byl zjištěn obsah THC 0,03 % a CBD 1,3 % [10], [11].

Odrůda Bialobřežské je pozdnější, pochází z Polska a je pěstována pro semeno i vlákno. Stejně jako Finola je konopí Bialobřežské také závislé na podnebí, úrodnosti půdy a dalších podmínkách, avšak jeho výška se běžně pohybuje nad 2,5 m. V České republice se sklízí v polovině září. Ve stejné studii jako u Finoly byl zjištěn obsah THC i CBD, který byl v obou případech vyšší. Množství THC bylo 0,11 % a CBD 4,2 % [10], [11].

Mezi další odrůdy konopí setého patří například i Fedora, Kompolti, Wojko, Futura 75, Ivory, Beniko, Felina 32, Fibrol a Carmagnola, která pochází z Itálie a dříve byla jednou z nejoblíbenějších odrůd díky vysoké kvalitě jejího konopného vlákna [9], [10].

## 2.2 Biologicky účinné metabolity konopí

Chemické složení konopí je nepřetržitě studováno, takže je stále objevována přítomnost dalších látek. Již na počátku nového tisíciletí se ve studiích uvádí přibližně 500 různých sloučenin, které se v konopí vyskytují, přičemž toto číslo stále roste. Mezi jednotlivými skupinami látek nalezneme sloučeniny primárního metabolismu, ovšem ty hlavní účinné složky patří mezi sekundární metabolity [12], [13].

Kanabinoidy jsou často uváděny jako hlavní biologicky aktivní látky, setkat se tak můžeme s čistými izolovanými látkami. Některé studie však docházejí ke stejnému závěru, a to, že kombinace kanabinoidů s dalšími účinnými látkami, které jsou přítomné v konopí, vede k synergickému působení známém jako tzv. *entourage effect* („doprovodný efekt“). Jedná se o pozitivní interakce směsí látek, které vzájemně účinkují tak, že je toto výsledné působení směsi silnější ve srovnání s účinkem samostatných látek. Pojem *entourage effect* byl původně použit při studiu jednoho specifického případu endogenních sloučenin (2-acylglycerolů). Později však bylo prokázáno, že se s tímto efektem můžeme setkat v podstatě v rámci jakékoliv rostliny prostřednictvím nejrůznějších chemických látek. V souvislosti s konopím je velmi významné synergické působení kanabinoidů a terpenů [14], [15].

Kromě kanabinoidů a terpenů můžeme v konopí nalézt například i flavonoidy, stilbeny, cukry, mastné kyseliny, vitamíny, aminokyseliny, aldehydy, proteiny a další skupiny látek [12].

### 2.2.1 Kanabinoidy

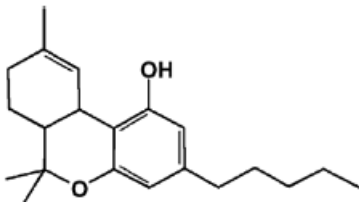
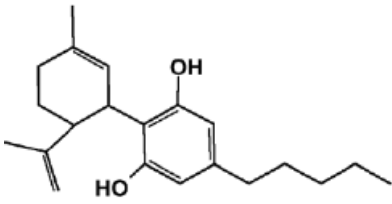
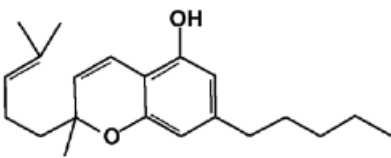
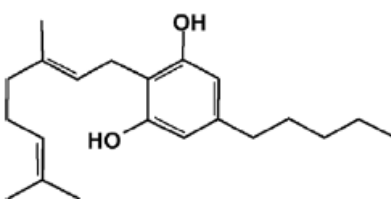
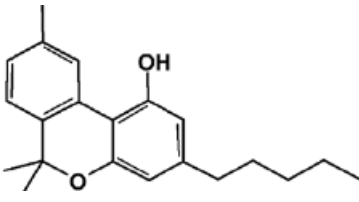
Kanabinoidy jsou patrně nejvíce studované biologicky aktivní látky konopí. Bylo jich popsáno více než 90, podle chemické struktury se ještě dále dělí do jednotlivých podskupin. Jedná se o sekundární metabolity, které se v rostoucím konopí vyskytují především jako kyseliny obsahující 22 uhlíků, po dekarboxylaci vzniká neutrální forma s 21 uhlíky [16].

Biosyntéza prekurzoru kanabinoidů začíná dvěma odlišnými drahami, které vedou ke tvorbě kyseliny olivetové (OLA) a geranyl pyrofosfátu (GPP). Jejich alkylací vzniká kyselina kanabigerolová (CBGA), což je kyselá forma kanabigerolu (CBG). Působením specifických enzymů na CBG vznikají jednotlivé další kanabinoidy, jako je  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD) a kanabichromen (CBC). Kanabinol (CBN) vzniká až degradací THC [16].

Biologické účinky kanabinoidů jsou velmi rozsáhlé a projevují se díky endokanabinoidnímu systému. Ten je tvořen specifickými enzymy, kanabinoidními CB receptory a endokanabinoidy (nejvýznamnější je anandamid a 2-arachidonoylglycerol), které se na tyto receptory váží. Tuto schopnost mají však i samotné kanabinoidy, které se také specificky váží na kanabinoidní receptory. Díky tomu mohou kanabinoidy ovlivňovat různé procesy v těle [16], [17].

Přehled nejznámějších základních kanabinoidů včetně některých jejich účinků je shrnut v následující tabulce (viz Tab. 1).

Tab. 1: Přehled základních kanabinoidů [1], [14], [16], [17], [18]

Název	zkratka	chemická struktura	účinky
$\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol	THC		psychoaktivní analgetický antioxidační protikřečový protizánětlivý
kanabidiol	CBD		není psychoaktivní antibakteriální anxiolytický protiplísňový protizánětlivý
kanabichromen	CBC		není psychoaktivní analgetický antimikrobiální protizánětlivý sedativní
kanabigerol	CBG		není psychoaktivní analgetický antibakteriální protiplísňový
kanabinol	CBN		není psychoaktivní antikonvulzivní protizánětlivý sedativní

### 2.2.2 Terpeny

V konopí se vyskytuje více jak 100 lipofilních terpenů, jejichž chemická struktura je tvořena jednotlivými izoprenovými jednotkami (5-ti uhlíkaté sloučeniny). Na základě jejich množství se pak terpeny dělí do jednotlivých skupin, přičemž nejvýznamnější zástupci této skupiny látek přítomných v konopí patří mezi monoterpeny, seskviterpeny a triterpeny, jejichž pozitivní účinky jsou velmi podobné [16].

Počátek biosyntézy terpenů se liší v závislosti na skupině, avšak pokračují tvorbou isopentenyl difosfátu (IPP), ze kterého vznikají přes geranyl pyrofosfát monoterpeny. Reakcí dvou molekul IPP a dimethylallyl difosfátu pak vzniká farnesyl pyrofosfát (FPP), což je prekurzor seskviterpenů a triterpenů [16].

Z terpenů se v čerstvém konopí nejčastěji vyskytují monoterpeny (limonen, myrcen a pinen). Jejich množství je však ve výsledku mnohem nižší a to zejména kvůli sušení konopí, ale také proto, že se jedná o těkavé látky. Z tohoto důvodu je v konopí větší relativní podíl seskviterpenů. D-limonen působí anxiolyticky, proti rakovině a bakteriím pojícími se s akné. Další zástupce monoterpenů je  $\beta$ -myrcen, který kromě anxiolytického účinku působí i analgeticky a protizánětlivě. Významný je také protizánětlivý  $\alpha$ -pinen. Nejznámějším seskviterpenem přítomným v konopí je  $\beta$ -karyofylen, který má protizánětlivý a protiplísňový účinek. Podle nejnovějších výzkumů se také jeví velmi slibně v oblasti dermatologie a v terapeutickém využití. Z triterpenů jsou nejznámější cykloartenol a  $\beta$ -amyrin se svými antibakteriálními, protiplísňovými a protizánětlivými účinky [14], [16].

### 2.2.3 Flavonoidy

Mezi nejznámější polyfenolické sloučeniny patří patrně flavonoidy. Tato skupina látek patří stejně jako kanabinoidy a terpeny mezi sekundární metabolity. V konopí je přítomno přibližně 20 flavonoidů. Mezi zástupce řadíme například kvercetin, luteolin, kanflavin A a kanflavin B. Flavonoidy zastávají v rostlině několik důležitých fyziologických funkcí a jsou také zdraví prospěšné. Flavony a flavonoly jsou podtřídy flavonoidů a konopí přispívají především svým protizánětlivým účinkem, působí však také proti rakovině. Polyfenoly jsou obecně známé díky antioxidačnímu účinku [13], [16].

### 2.2.4 Stilbeny

Stilbeny řadíme také mezi polyfenolické látky a sekundární metabolity, přičemž v konopí jich bylo stanoveno 19. U těchto sloučenin byl pozorován protizánětlivý, antimikrobiální a antioxidační účinek. Některé studie se pak přímo zabývají antimikrobiálním účinkem stilbenů přítomných v konopí [13].

## 2.3 Využití konopí

Oblasti využití konopí jsou různorodá a to díky univerzálnosti a jedinečnosti této rostliny. Jako surovina je konopí používáno hlavně v průmyslu (textilní, stavební, automobilový, papírenský, energetický a další), kde se využívají všechny části této rostliny. Hlavní účinné látky zase umožňují aplikovat konopí nejen v medicíně, ale také v kosmetickém a potravinářském průmyslu [3].

### 2.3.1 Technické konopí

Vyšlechtěné konopí s nižším obsahem THC nachází uplatnění v mnoha různorodých oblastech. Dnes se podle některých odhadů můžeme setkat s několika tisíci produkty technického konopí, zahrnující například potravinářství, kosmetiku a konstrukční materiály, ale také průmysl textilní a papírenský, kde je konopí využíváno již několik tisíc let. Konopí, jako materiál pro produkci oblečení, pláten a provazů, patřilo vždy k hlavním možnostem využití. Nejvíce zužitkované části konopí je konopné vlákno a semeno [3], [19], [20].

Vlákna získaná z konopného stonku lze dělit na primární a sekundární vlákna, která tvoří kratší koudel. Pro konopné látky a jako izolační materiál se hodí právě primární vlákno, což se využívá zejména ve stavebnictví a v textilním průmyslu. Sekundární vlákna nacházejí uplatnění jako recyklační aditiva. Další částí stonku je jeho dřevitá část neboli pazdeří, které je využíváno ve výrobě stavebních hmot, jako absorbent a podestýlka pro zvířata. Vlákno a pazdeří je také využíváno v automobilovém průmyslu při výrobě některých částí aut. Konopné stonky představují díky svému složení ideální biomasu, takže jejich využitelnost sahá až do oblasti energetiky [3], [8], [21].

Konopné semínko je využíváno především v potravinářství, například pro výrobu mouky, ale také jako samostatná potravina. Jedná se o velmi výživnou surovinu hlavně díky obsahu nenasycených mastných kyselin a snadno stravitelným bílkovinám. Ze semínek se pak lisuje velmi kvalitní konopný olej, který lze využít nejen v potravinářství, ale také v kosmetice a dalších odvětvích. Jeho nevýhodou je však nestabilita, musí tak být uchováván v tmavých nádobách, jinak může docházet ke žluknutí. I přesto je konopný olej oblíbenou složkou různých pleťových mlék, hydratačních krémů, mýdel a šampónů. Napomáhá při léčbě akné a lupénky právě také díky obsahu nenasycených mastných kyselin. Kromě kosmetiky a jako zdraví prospěšný doplněk stravy se konopný olej používá i v nátěrech, palivech a při výrobě dalších produktů [3], [21].

I přesto, že je konopí zpracováváno už po staletí, možnost zdokonalení se nabízí vždy. Proto v poslední době opět probíhají další nové výzkumné projekty, které mají za cíl vyvinout nové výrobní metody zpracování pro modernizaci produkce [20].

### 2.3.2 Lékařské konopí

Konopí bylo a je využíváno i v medicíně. Právě původní odrůdy konopí byly pro lékařské účely pěstovány v Indii již několik set let před Kristem. Obecně jsou uznávány prospěšné účinky při zmírňování bolesti, konopí ale také zklidňuje v případě nervových poruch [12].

Za posledních padesát let bylo vydáno více než tisíc publikací, které se zabývají danou problematikou. Mezi diskutované účinky konopí se řadí účinky analgetické, antimikrobiální, protirakovinné a mnohé další. Konkrétně je konopí spojováno s pozitivním vlivem na onemocnění jako je například revmatismus, nespavost, dna, astma a zmiňovaná bolest [12].

Z medicínského hlediska patří mezi nejvýznamnější účinné složky konopí právě kanabinoidy, konkrétně THC a CBD. V mnoha zemích se v posledních letech můžeme setkat s lepší dostupností léků na bázi kanabinoidů, které lze získat jako klasický léčivý přípravek anebo přímo v rostlinné formě [22].

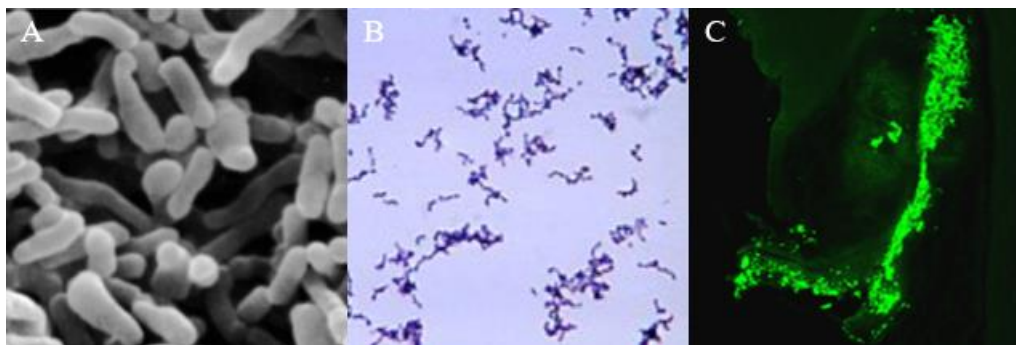
## 2.4 *Propionibacterium acnes*

*Propionibacterium acnes* je bakterie, která je běžně součástí mikroflóry kůže, ústní dutiny, vnějšího zvukovodu, spojivky a tlustého střeva. Díky jejímu četnému rozšíření, které je považováno za normální, není často brána v potaz jako příčina onemocnění. Tento patogen tak může způsobovat různé druhy infekcí, obecně je však nejznámější účast této bakterie na průběhu akné [23].

### 2.4.1 Charakteristika bakterie

*Propionibacterium acnes* je grampozitivní bakterie, která nevytváří spory, což jsou klidové dormantní buňky vytvářené při nepříznivých podmínkách. Z morfologického hlediska se jedná o pleomorfní tyčinku s velikostí v rozmezí 0,5–5  $\mu\text{m}$  (viz Obr. 2A – záznam z elektronového mikroskopu). Jelikož se jedná o grampozitivní bakterii, její buněčná stěna je tvořena převážně peptidoglykanem a nejsou v ní přítomny prakticky žádné lipidy. Díky této stavbě je buněčná stěna grampozitivní bakterie nepropustná pro organická rozpouštědla, tudíž výsledkem Gramova barvení je modrofialové zbarvení bakterií, které přetrvává i po působení těchto rozpouštědel (Obr. 2B) [23], [24], [25], [26].

Podle nároků na kyslík se *Propionibacterium acnes* řadí mezi anaerobní bakterie. Často se však můžeme setkat s tvrzením, že je mikroaerofilní. Dokáže snášet přítomnost kyslíku (až 100 % saturace), ovšem v tomto případě je rychlost růstu bakterie nižší, proto se hojně vykytuje především v anaerobním prostředí. Na kůži tak můžeme *Propionibacterium acnes* nalézt například uvnitř vlasového folikulu, což je zobrazeno pomocí imunofluorescenční mikroskopie na obrázku níže (Obr. 2C) [24], [27].



Obr. 2: *Propionibacterium acnes* [27], [28] – upraveno

U *Propionibacterium acnes* byly popsány 3 různé fenotypy – Typ I, Typ II a Typ III, přičemž u Typu I byly identifikovány i další podskupiny. Právě význam existence různých fenotypů bakterie je předmětem některých studií, kde se snaží dávat do souvislosti konkrétní fenotyp s onemocněním, které by mohl potencionálně vyvolávat [23].

Díky tomu, že výsledkem metabolismu *Propionibacterium acnes* je řada produktů navozujících interakce s imunitním systémem, jedná se o patogenní bakterii. Ovšem velmi často bývá obtížné jej určit jako cílový patogen způsobující dané onemocnění, jelikož je brán jako běžná součást mikroflóry [23], [24].



## 2.4.2 Metabolismus

*Propionibacterium acnes* je chemoorganotrofní bakterie s převahou fermentačního metabolismu. Bakterie vyžaduje komplexní výživu, přičemž hexózy či laktát jsou fermentovány převážně na kyselinu propionovou a octovou [26].

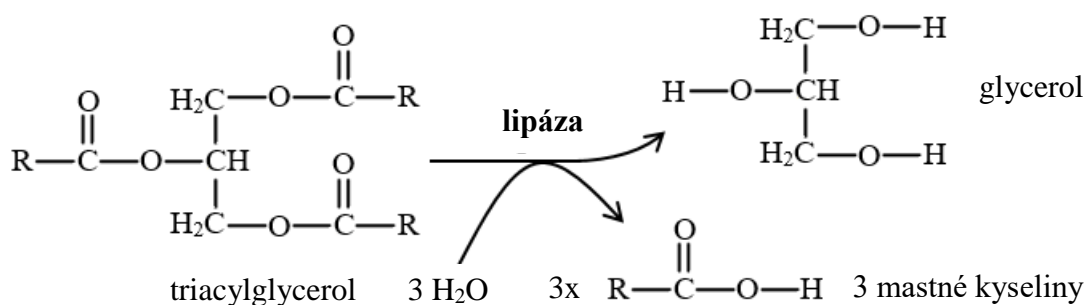
Metabolismus *Propionibacterium acnes* představuje složitý celek biosyntetických a degradačních drah. Kromě základních drah, jako je třeba fermentace, glykolýza, citrátový cyklus a biosyntéza aminokyselin, jsou u této bakterie významné i detoxifikační reakce, například antibiotická rezistence. Nejtypičtější metabolickou drahou však zůstává propionové kvašení, po které je *Propionibacterium acnes* zároveň i pojmenována. Jelikož se jedná o anaerobní až mikroaerofilní bakterii, svůj metabolismus je schopna přizpůsobit podle přítomnosti kyslíku. Při anaerobních podmínkách převažuje fermentace, u které jsou produktem mastné kyseliny s krátkými řetězci. Může však využívat také anaerobní respirace díky enzymům, jako jsou fumarát reduktáza a dimetylsulfoxid reduktáza. *Propionibacterium acnes* disponuje také všemi potřebnými složkami oxidační fosforylace [29], [30].

Výsledkem metabolismu *Propionibacterium acnes* jako parazita jsou také některé produkty, které mohou degradovat přítomné látky, respektive tak ovlivňovat stav svého hostitele. Zásadní v mnoha ohledech je produkce porfyrinů a některých proteinů, konkrétně enzymů jako jsou lipázy, hydrolázy, esterázy a proteázy [23], [30].

## 2.4.3 Bakteriální lipáza

Jednou z nejvýznamnějších lipáz, kterou *Propionibacterium acnes* produkuje, je GehA lipáza (glycerol-ester hydroláza A). Právě tento enzym katalyzuje hydrolýzu lipidů ve vlasových folikulech, což je spojeno s rozvojem akné. Průběh reakce je zobrazen na následujícím obrázku, přičemž lipáza působí na esterovou vazbu triacylglycerolu (viz Obr. 3). Z triacylglycerolu vzniká za účasti GehA lipázy glycerol a 3 molekuly mastných kyselin. Právě tyto mastné kyseliny působí dráždivě a zánětlivě, navíc zvyšují adhezi bakterie k buňkám folikulu, což podporuje tvorbu biofilmu. Mimo to samotný glycerol ještě může vyvolat další růst *Propionibacterium acnes*, jelikož se jedná o zdroj živin [31], [32].

Obecně u mikrobiálních lipáz jsou zmiňovány některé procesy, u kterých mohou nějakým způsobem figurovat. Kromě hydrolýzy tuků, možným zánětlivých reakcím a zvýšené adhezi může produkce lipáz představovat jakýsi typ obrany nebo také působit synergicky s jinými enzymy [33].



Obr. 3: Degradace tuků působením lipázy [32]

#### 2.4.4 Tvorba biofilmu

Velká část bakterií tvoří biofilmy, což jsou bakteriální kolonie uchycené v extracelulární matrix k danému povrchu. U těchto biofilmů byla prokázána vyšší odolnost vůči působení antibiotik a také souvisí s řadou onemocnění [27].

*Propionibacterium acnes* je schopna tvořit biofilm, který hraje důležitou roli při vzniku infekce. V genomové sekvenci byly identifikovány tři skupiny genů kódující enzymy, které jsou potřeba pro syntézu adhezivních proteinů a extracelulárního polysacharidu, což jsou zásadní složky potřebné pro tvorbu biofilmu. Biofilm *Propionibacterium acnes* se tvoří i ve vlasovém folikulu, což je možné přímo pozorovat u kožních projevů akné. Tento biofilm je zobrazen v kapitole 2.4.1 (viz Obr. 2C) [23], [27].

#### 2.4.5 Onemocnění spojená s *Propionibacterium acnes*

I když je *Propionibacterium acnes* spjato hlavně s akné, není to jediná infekce, na které se podílí. Mezi další onemocnění, které přímo způsobuje, patří například i pooperační infekce, oční a zubní infekce a endokarditida. Podle některých studií může být s touto bakterií spojena také rakovina prostaty, ale i další. Vybrané příklady onemocnění jsou podle role *Propionibacterium acnes* shrnuty v následující tabulce Tab. 2 [23].

Tab. 2: Onemocnění spojená s *Propionibacterium acnes* [23]

Onemocnění, která <i>Propionibacterium acnes</i> :	
<b>způsobuje</b>	zubní infekce, oční infekce, endokarditida, pooperační infekce, neurochirurgické infekce, infekce centrální nervové soustavy, mozkomíšní shunt, kloubní infekce
<b>ovlivňuje</b>	akné vulgaris, bakteriální granulom
<b>potencionálně ovlivňuje</b>	rakovina prostaty, primární biliární cirhóza, sarkoidóza (systémové granulomatózní onemocnění), ateroskleróza, ischias (bolesti dolní části zad)

V odborné literatuře byly popsány některé pooperační infekce způsobené *Propionibacterium acnes*. Především u spondylodiscitidy, neboli zánětu meziobratlové ploténky, byla zjištěna přítomnost právě této bakterie. To souvisí s předcházející operací díky výskytu velkého množství *Propionibacterium acnes* na pokožce, respektive v oblasti zad [23], [34].

Endokarditida, tedy infekční onemocnění postihující srdce, má nejčastěji ložisko na chlopenním nebo nástěnném endokardu (srdeční nitroblána). I když je infekční endokarditida poměrně vzácná, bývá podceňována. Endokarditidu způsobuje také *Propionibacterium acnes*, přičemž 79 % těchto infekcí postihuje srdeční protězy, mezi které řadíme například infekce umělých srdečních chlopní a kardiostimulátorů [23], [34].

Některé nedávné studie také spojují *Propionibacterium acnes* s rakovinou prostaty. Tato bakterie byla izolována z tkáně prostaty pacientů trpících zánětem nebo rakovinou prostaty. Právě u těchto epitelových buněk prostaty dochází k infekci způsobující zánětlivou reakci a transformaci, které by mohly mít následně vliv na rozvoj rakoviny [23].

## 2.5 Akné

Akné je zánětlivé chronické onemocnění mazových žláz a vlasových vývodů postihující především oblast obličeje, hrudníku a zad, kde se nachází v největší míře. Akné se vyskytuje zejména v pubertě, ovšem můžeme přetrvávat i potom. Alespoň jednou za život se s tímto onemocněním setká až 80 % populace [31], [35], [36].

Na akné má vliv mnoho faktorů, které se projevují v různé míře aknózními projevy. Na základě toho můžeme akné dělit do tří základních skupin. Do první skupiny patří formy akné podmíněné vnitřními dispozicemi, mezi které řadíme například *acne vulgaris*, *acne neonatorum*, předmenstruační akné nebo *acne tropicalis*. Dále se setkáváme s akné podmíněným zevními faktory, jako je kosmetické akné nebo akné olejová. Poslední skupinou je tzv. akneiformní akné způsobené užíváním některých léků nebo vitamínů, například B6 a B12 [35].

### 2.5.1 Faktory ovlivňující akné

Akné je považováno za tzv. multifaktoriální onemocnění, jelikož se na jeho vzniku a průběhu podílí hned několik faktorů. Tyto faktory pak mohou mít větší či menší vliv na celkový vývoj onemocnění. Příčiny mohou být vnitřní anebo zevní, přičemž právě vnitřní faktory mají mnohem větší význam a uplatňují se větší míře [35].

V první řadě hraje u akné důležitou roli zvýšená tvorba kožního mazu, jehož složení je uvedeno v Tab. 3. Sebum (kožní maz) je produkováno specializovanými buňkami, které se nazývají sebocyty. Zvýšená činnost mazových žláz je způsobena především androgeny, což jsou pohlavní hormony. Dále pak také hormony podvěsku mozkového, štítnou žlázou nebo působením centrálního nervového systému. Do jisté míry je funkce mazových žláz ovlivněna i psychikou a dietou [35], [37].

Tab. 3: Složení kožního mazu [37]

Složka	sebum [%]	epidermální lipidy [%]
triacylglyceroly	30–50	30–35
volné mastné kyseliny	15–30	8–16
estery vosku	26–30	-
skvalen	12–20	-
estery cholesterolu	3–6	15–20
cholesterol	1,5–2,5	20–25

Dalším důležitým vnitřním faktorem je zvýšená a zrychlená produkce zrohovatělých buněk. Tím se myslí hlavně rohové buňky ve folikulech a ve vývodech mazových žláz. Zdravá kůže se průběžně obměňuje tak, že jsou zrohovatělé buňky vytlačovány na povrch pokožky ve formě jednotlivých šupinek. U aknózní pleti jsou tyto buňky více přilnavé, tudíž nedochází k pravidelnému odlučování, což má za následek ucpávání a hromadění mazu [35].

*Propionibacterium acnes* je hlavní zástupce bakteriální flóry, která se uplatňuje až v průběhu onemocnění. Tyto bakterie nemají přímý vliv na vznik akné, jelikož způsobují až zánětlivou reakci po zvýšené tvorbě mazu. Kožní mikroflóru tvoří především grampozitivní bakterie, jako jsou například *Corynebacterium* a *Micrococcus* [35], [38].

Mezi další vnitřní faktory patří například genetická dispozice a psychosomatické souvislosti. V některých případech mohou mít na akné vliv i některé potraviny, mechanické dráždění, sluneční záření a mnoho dalších faktorů [35].

Zevní faktory mohou také ovlivňovat vznik a průběh akné, ovšem jejich vliv není tak zásadní jako výše zmíněné. Jmenovat lze například používání nevhodných kosmetických produktů [35].

### 2.5.2 Vznik a průběh akné

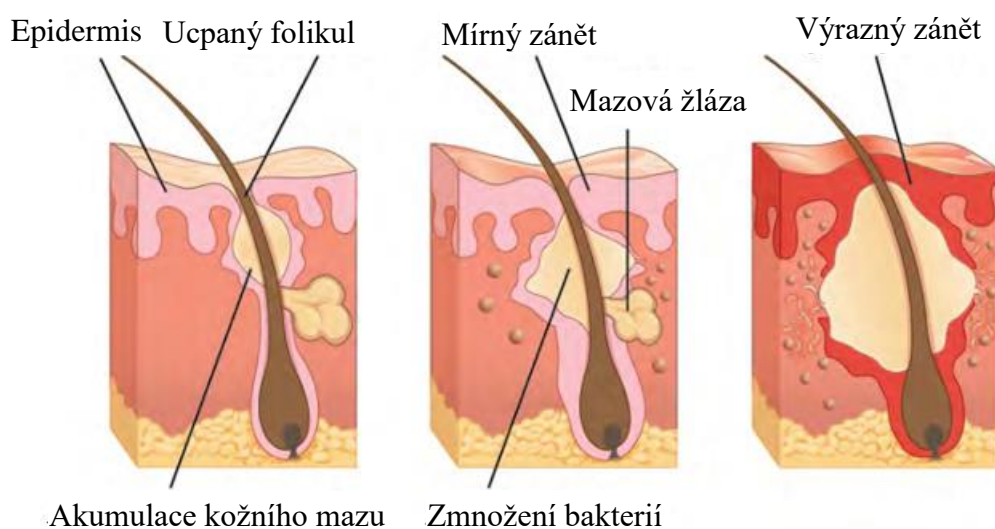
Průběh onemocnění akné lze rozdělit do několika kroků, které jsou znázorněny na Obr. 4.

Rozvoj a samotný vznik akné má své počátky ve vývodech folikulu mazových žláz. Tady totiž dochází k nahromadění zrohovatělých buněk, čímž se ucpává vývod. Zároveň se více produkuje maz, který ovšem nemůže odcházet na povrch kůže, a tak vznikají mikrokomedony [35].

V dalším kroku se hromadí rohové buňky i maz, tvoří se uzavřené a otevřené komedony, což je první viditelný projev akné. Jelikož nedochází k uvolnění mazové žlázy, dochází k dalšímu plnění, které vede k rozvoji otevřených komedonů [35].

Díky komedonům je tak vývod mazové žlázy uzavřen a tím zde vzniká ideální prostředí i podmínky pro růst mikrobů, především *Propionibacterium acnes*. Právě tato bakterie produkuje enzymy štěpící maz, který je přítomný ve větším množství. Rozkladem tuků vznikají mastné kyseliny, přičemž některé z nich mohou dráždit stěnu folikulu, která se tak může stát méně odolnou. Jestliže dojde k prasknutí folikuly, tento obsah se prakticky může jevit jako cizorodá látka a vzniká tak zánětlivá reakce [35].

Dalším projevem jsou pupínky, vředy, cysty, neštovičky a další. U těžkých zánětů může v důsledku zničení celé mazové žlázy vzniknout jizva. Podle způsobu hojení rozlišujeme jizvy atrofické, hypertrofické a keloidní [35].



Obr. 4: Průběh vzniku akné [39] – upraveno

### 2.5.3 Léčba akné

K léčbě akné lze přistupovat několika cestami. V první řadě je zde lékařem vedená klasická léčba, která je založena na předepisování různých léčiv a krémů. U lehčích forem akné lidé často vyhledávají pouze kosmetické prostředky obsahující různé léčivé složky. A jako u mnoha dalších onemocnění i u akné mnozí spoléhají na tradiční medicínu zahrnující především využití léčivých rostlin [40], [41].

Doporučené základy pro léčbu akné v Evropě jsou formulovány v „European Evidence-based (S3) Guidelines for the Treatment of Acne“. Lékaři dnes obecně preferují kombinovanou terapii, ale i tak je léčba akné záležitostí na několik let (průměrně 3–4 roky). K prvnímu zlepšení stavu pleti při úspěšné léčbě dochází až po několika týdnech. Základem léčby bývá místní nebo celková terapie, přičemž se zaměřuje především na léčbu již existujících projevů akné, případně se zabrání dalším komplikacím nebo opětovnému zánětu [41], [42].

Přehled typů léčby s příklady používaných léčiv a jejich účinky jsou uvedeny v následující tabulce Tab. 4.

Tab. 4: Přehled léčiv a metod [41], [42]

Typ léčby	léčivo	účinek
místní	benzoylperoxid	antibakteriální, keratolytický (normalizující keratinizaci)
	retinoidy	komedolytický, zabraňují tvorbě nových komedonů, protizánětlivý, sebostatický
	lokální antibiotika	protizánětlivý, antimikrobiální
	kyselina azelaová	komedolytický, antimikrobiální, protizánětlivý
	kyselina salicylová	keratolytický, protizánětlivý
celková systémová	antibiotika	protizánětlivý, antimikrobiální
	hormonální antikoncepce	snížená tvorba mazu
	vakcíny	antibakteriální
doplňkové metody	chirurgické metody	zlepšení stavu pleti, řešení přidružených projevů (jizvy)
	laser	
	fototerapie	
	kryoterapie	
	léčebná kosmetika	

Místní terapie představuje lokální aplikaci daného léčiva přímo na postižené oblasti. Příklady těchto léčiv jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 4). Retinoidy se řadí mezi jedny z nejúčinnějších léčiv a jako zástupce lze uvést tretinoin a adapalen, který má širší oblasti účinků (sebastatické, protizánětlivé). U lokálních antibiotik je potřeba striktně dodržovat rady lékařů, jelikož je zde riziko vzniku rezistence. Patří sem erythromycin, kyselina fusidová, clindamycin a tetracyklinová skupina antibiotik [42].

U těžších forem akné, nebo jestliže není místní terapie dostatečná, se následně pokračuje celkovou terapií (viz Tab. 4). Antibiotika podávaná orálně (tetracyklinová řada, erythromycin, clindamycin, makrolidová antibiotika) redukuje především počet *Propionibacterium acnes*. U žen je zde možnost využití kombinované hormonální antikoncepce, která ovlivňuje metabolismus androgenů, což má za následek snížení produkce kožního mazu. Z vakcín se nejčastěji využívají bakteriální lyzáty *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus* [41], [42].

Pro léčbu akné lze také využít doplňkové metody, které se zabývají především řešením následků tohoto onemocnění nebo mají preventivní účinek. Nejznámější příklady těchto metod jsou uvedené v tabulce Tab. 4 [42].

Mnoho lidí však raději používá běžně dostupné výrobky proti akné, jako jsou různé krémy, čisticí prostředky, mýdla nebo pleťové vody. Ty působí především protizánětlivě, redukuje množství mazu, důležitý je však i jejich zvláčňující účinek. Tyto přípravky obsahují například hydroxy kyseliny (glykolová, mléčná, salicylová), zinek, vitamíny (retinol, nikotinamid), allantoin, glycerol a další [40], [43].

V poslední době se začíná do popředí opět dostávat bylinná léčba akné. Mezi výhody patří především dobrá tolerance, menší množství vedlejších účinků, cena, ale také dlouhodobá historie využívání bylin v medicínských oblastech. Rostlinné preparáty se užívají samostatně, v některých případech v kombinaci s klasickými léčivy. S akné je často spojováno využití heřmánku pravého, měsíčku lékařského nebo levandule lékařské. Mezi další známé a hojně využívané rostliny patří i aloe vera gel, tea tree oil nebo pleťová voda ze zeleného čaje. Dále pak například třapatka nachová, rakytník řešetlákový, konopí seté a mnoho dalších. Tyto rostliny působí nejčastěji antibakteriálně, protizánětlivě a jako antioxidant, přičemž obsahují hned několik aktivních sloučenin (polyfenoly, vitamíny a další) [36].

#### **2.5.4 Vliv aktivních látek konopí na akné**

Z konopí se přímo pro léčbu akné využívají účinné látky v podobě konopných extraktů. V první řadě jsou zde kanabinoidy, které vykazují především antibakteriální a protizánětlivý účinek. Podle nedávných studií má endokanabinoidní systém vliv na různé biologické procesy v kůži, mimo jiné i na mazové žlázy. Nejnovější metody léčby akné tak využívají kontrolovanou sekreci kožního mazu pomocí endokanabinoidního systému. Konkrétně pak CBD ovlivňuje produkci lipidů v sebocytech, což má následně vliv na průběh akné. Dále pak proti *Propionibacterium acnes* působí terpenoid limonen, který by podle výsledků některých studií mohl mít i protizánětlivý účinek [14], [36], [44].

Pro doplnění péče při léčbě akné je také velmi oblíbené použití konopného oleje, a to hlavně díky vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin. V největším množství je zde zastoupena kyselina linolová (50–60 %) spolu s kyselinou  $\alpha$ -linolenovou (20–25 %). Tyto dvě mastné kyseliny a kyselina  $\gamma$ -linolenová jsou součástí fosfolipidů v buněčných membránách a jsou zodpovědné za několik důležitých funkcí. Konopný olej také zlepšuje jemnost pleti, protože je důležité doplňovat lipidy kůže během léčby akné, která je pro pokožku značně náročná. Mimo to kyselina linolová působí i proti grampozitivním bakteriím, tedy i proti *Propionibacterium acnes* [44], [45].

## 2.6 Stavba kůže

Kůže představuje se svou plochou 1,5–2 m<sup>2</sup> největší orgán lidského těla. Mezi její hlavní funkce patří ochrana proti vnějším fyzickým, chemickým i biologickým vlivům. Důležitá je i role v termoregulaci, stejně jako prevence proti nadměrné ztrátě vody. Kromě těchto hlavních funkcí má kůže i funkci společensko-komunikační. I když se nejedná o životně důležitou funkci, vzhled může ovlivnit řadu věcí. Kůže se skládá ze tří základních částí – pokožka, škára a podkožní tkáň (viz Obr. 5). Zároveň na úplně nejsvrchnější vrstvě můžeme najít ještě lipidový film, který má funkci bariéry [35], [46], [47].

### 2.6.1 Lipidová bariéra

Na pokožce se nachází lipidový film, který se skládá z odlupujících se buněk a z produktů mazových a potních žláz. Mezi nejdůležitější funkce této bariéry patří ochrana a odolnost vůči nejrozličnějším negativním vlivům. Zároveň také působí proti vyplavování hydrofilních komplexů [35].

### 2.6.2 Pokožka (*epidermis*)

Pokožka neboli *epidermis* je vrstevnatá část kůže, která je tvořena několika typy buněk, primárně keratinocyty a dendritickými buňkami, ale také melanocyty tvořícími pigment, Langerhansovými a Merkelovými buňkami [46].

*Epidermis* lze rozdělit do čtyř vrstev na základě toho, kde v pokožce se nachází keratinocyty (v jaké fázi), jaký je jejich tvar a zda mají jádro. Na povrchu se nachází rohová vrstva (*stratum corneum*), která je z vrchu pokryta lipidovým filmem. Pod ní jsou vrstvy zrnitá (*stratum granulosum*) a ostnitá (*stratum spinosum*). Nejhlubší vrstva *epidermis* se nazývá bazální vrstva (*stratum basale*) [46], [47].

Pokožka se neustále obnovuje, přičemž cyklus zrání buněk pokožky se většinou pohybuje mezi 25 a 28 dny. Za tuto dobu buňky prochází z bazální vrstvy až na povrch vrstvy rohové. Na počátku mají bazální buňky jádro a jsou schopny se dělit. Postupně se buněčné jádro rozpadá a buňky se zplošťují. Právě tyto bezjaderné buňky tvoří rohovou vrstvu a od pokožky se oddělují ve formě malých šupinek. Správná regenerace kůže je tedy závislá na průběžné výměně zrohovatělých buněk [35].

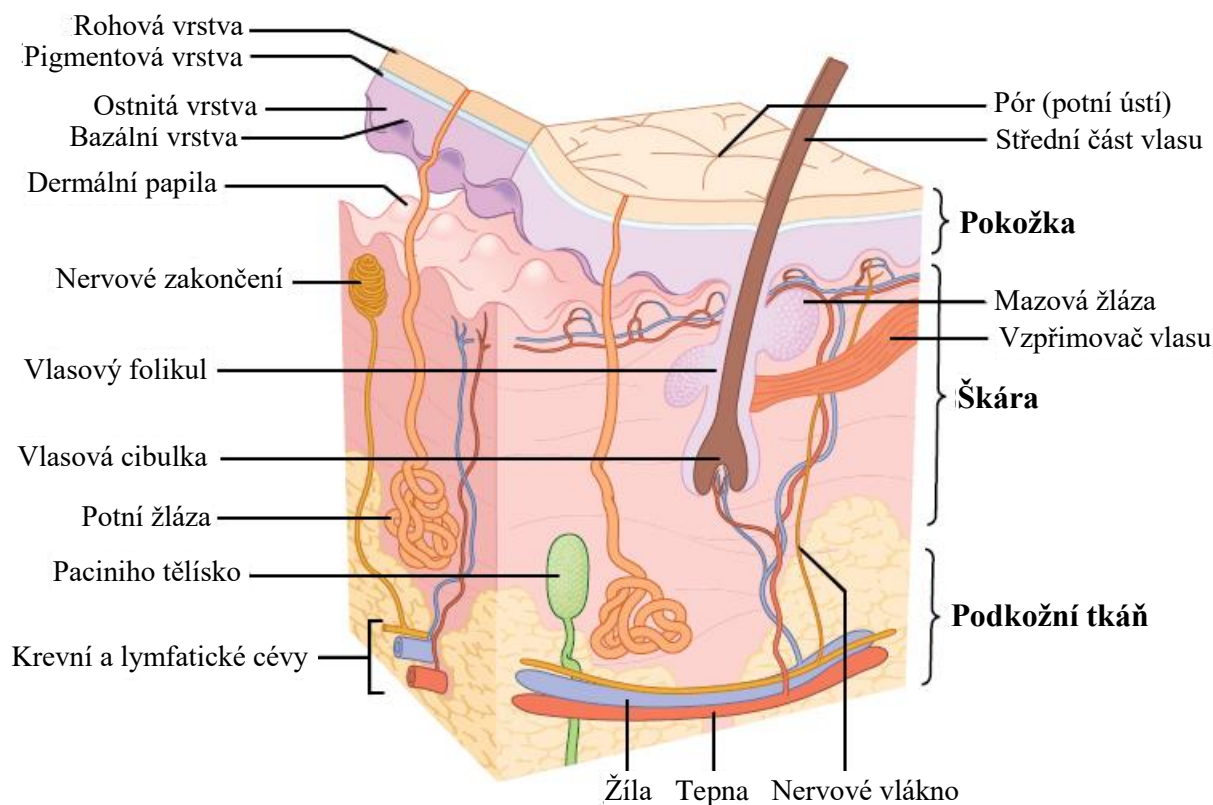
### 2.6.3 Škára (*dermis*)

Škáru tvoří gelová hmota představující směs vody, aminokyselin, bílkovin, sacharidů a elektrolytů. Právě složení škáry nám podává informaci o elasticitě a napětí neboli turgoru kůže. Tyto dvě specifikace se v průběhu života mění, přičemž postupem času dochází k jejich poklesu, což se projevuje stárnutím. Je to tedy část kůže, kde si lze jako první povšimnout projevů doprovázející stárnutí [35], [47].

V *dermis* se nachází cévy, nervy, kolagenová a elastická vlákna. Na rozdíl od pokožky nedochází k diferenciaci a lze určit vnitřní strukturu v závislosti na hloubce. Do škáry také z části zasahují kožní adnexa, což jsou vlasy, nehty, chlupy, mazové a potní žlázy [35], [46].

### 2.6.4 Podkožní tkáň (*tela subcutanea*)

Podkožní tkáň představuje z velké části tkáň tuková, která je tvořena tukovými buňkami, krevními a lymfatickými cévami, rovněž jsou zde umístěny nervy. Jedná se o nejspodnější vrstvu kůže, která není konstantní, jelikož se její tloušťka může lišit na různých místech těla. Funkce podkožní tkáně je především ochranná [35].



Obr. 5: Stavba kůže [48] – upraveno



## 2.7 Kosmetické přípravky

Kosmetické přípravky jsou produkty zastávající několik funkcí. Jejich účinky a použití mohou být velmi rozmanité, avšak obecně lze říci, že jsou určeny k odstranění nečistot, mikroorganismů, kožního mazu a jiných nežádoucích látek. Používají se také ke snížení nechtěných kožních projevů, pomáhají obnovovat a ochraňovat pokožku [49].

Kosmetické produkty mohou být definovány různými způsoby. V Evropské Unii rozlišujeme kosmetické přípravky (kosmetika) a léčivé kosmetické přípravky (léčiva). Základním rozdílem je to, že kosmetika neobsahuje aktivní látku, nedeklaruje účinek, může být aplikována pouze na vnější části lidského těla a je určena např. k čištění, parfemování, ochraně a udržování v dobrém stavu. Léčivé kosmetické přípravky již obsahují aktivní látku, která zajišťuje terapeutický účinek a ovlivňuje lidský organismus, jsou tedy určeny k léčení nebo prevenci onemocnění. Na pomezí těchto dvou pojmů je pak kosmeceutika, která však není uznávána a povolena všemi institucemi. Vyznačuje se viditelnými a měřitelnými účinky na pokožku, rozpoznat ji lze i díky účelu, tedy tvrzení o jejich zamýšlenému použití [50].

Kosmetické přípravky podléhají samozřejmě legislativě a jsou značně regulovány. Tyto produkty musí ještě před počátkem výroby projít registrací a schvalováním, poté následuje výroba, kontrola používání jednotlivých složek přípravku, testování a bezpečnost, balení a etiketování, import. Tyto regulace mají za úkol především chránit spotřebitele a umožnit mu přístup k důležitým informacím, jako je identifikace výrobku. Požadavky na označování jsou přesně stanoveny, musí být uvedeno jméno a adresa odpovědné osoby, země původu, nominální obsah, expirace, bezpečnostní opatření, šarže, funkce kosmetického přípravku a seznam všech složek, které jsou uvedeny v sestupném pořadí dle procentuálního obsahu v daném produktu (pod 1 % mohou být v libovolném pořadí) [50].

### 2.7.1 Základní složky

Kosmetické přípravky jsou tvořeny směsí základních složek v dané kosmetické formě (vehikulum). Všechny přípravky tedy obsahují řadu kosmetických přísad, které mají za úkol vytvořit potřebnou texturu, pH, barvu, vůni a další. Některé kosmetické přípravky obsahují ještě účinnou látku (aktivní nebo bioaktivní) [50].

Kromě základních složek obsahují tedy kosmetické přípravky dle typu produktu i další ingredience. V kosmetice tak mohou být přítomny bioaktivní funkční látky, jako jsou například rostlinné extrakty, které jsou známé díky antioxidačním, antimikrobiálním a protizánětlivým účinkům. Léčivé kosmetické přípravky obsahují zase aktivní látky zajišťující deklarovaný účinek. Z chemického hlediska to mohou být velmi rozmanité molekuly. Plet'ový čistící gel tak považujeme pouze za kosmetiku, může ale obsahovat bioaktivní složky. Jeho účelem je vyčistit pleť, aby si tak udržela svůj zdravý vzhled, čímž může napomáhat ke zlepšení jeho stavu. Plet'ový čistící gel, který obsahuje aktivní látku určenou k léčbě akné lze považovat za léčivý kosmetický přípravek [50], [51].

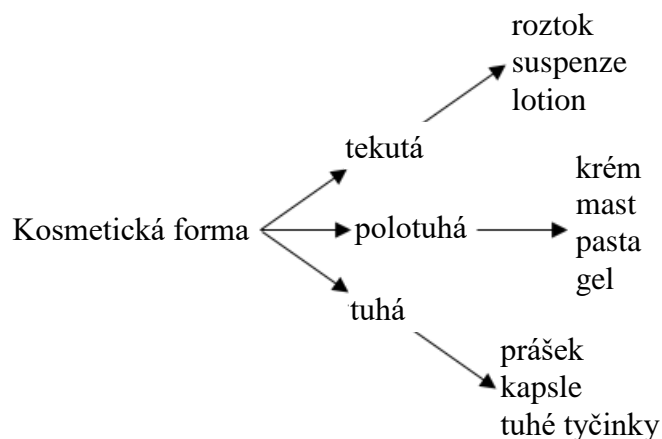
Základní složky kosmetických přípravků se nejčastěji dělí na základě jejich funkce v produktu. Hlavní typy složek kosmetických přípravků s jejich účinkem a konkrétním příkladem jsou uvedeny v následující tabulce (viz Tab. 5) [50].

Tab. 5: Složky kosmetických přípravků [50]

Název složky	účinek	příklad
rozpouštědlo	rozpouští pevné složky, umožňuje formulaci přípravku, upravuje vlastnosti přípravku (viskozita, stabilita)	voda, glycerol, ethanol, oleje, vazelína
zahušťovadlo	zvyšuje viskozitu, zlepšuje stabilitu	polyetylglykol, karbomery, cetylalkohol, xanthanová guma
zvlhčovadlo	hydratuje, udržuje vlhkost v pokožce, působí proti praskání a podráždění	glycerol, močovina, rostlinné oleje, parafín, cetylalkohol
konzervační přísada	zamezuje růstu mikroorganismů	fenoxietanol, parabeny, glutaraldehyd
surfaktant	snižuje povrchové napětí, upravuje např. pěnění, čistící a kondicionační účinek	stearát trietanolaminu, polysorbáty, stearalkonium chlorid, cetylalkohol, kokamidopropylbetain
antioxidant	ochrana proti volným radikálům, stabilizace produktu	vitamin A, vitamin C, vitamin E, polyfenoly
plastifikátor	zlepšení flexibility	kafr, estery kyseliny citronové, dimethikon
pH pufr	úprava pH	kyselina citronová, hydroxid sodný
chelatační činidlo	stabilizace produktu	kyselina citronová
abrazivum	exfoliační účinek (podporuje odlupování rohové vrstvy)	semena plodů, polyetylenové a polypropylenové kuličky, minerální prášky
hnací plyn	udržení tlaku v aerosolových produktech	isopentan, propan, butan
parfemace	zajišťuje vůni produktu, maskování zápachu	esenciální oleje, linalool
barvivo	obarvení produktu	pigmenty, oxid titaničitý
sladidlo	oslazuje přípravek	sacharin, aspartam, sorbitol
ochucovací činidlo	zajišťuje chuť produktu	pepermint, mentol, jahody, čokoláda

### 2.7.2 Klasifikace kosmetických přípravků

V kosmetice se můžeme setkat s pojmem dávková forma, která je definována jako konečná fyzikální forma směsi chemických složek. Právě výběr celkové kosmetické formy (vehikulum s danou látkou) je zcela zásadní pro kompatibilitu všech přísad, aplikaci a dosažení požadovaného účelu. Tento systém může být prakticky jakékoliv vehikulum, které zajistí dostupnost potřebných složek v daném místě. Základní dělení je na Obr. 6 [50], [52].



Obr. 6: Přehled kosmetických forem [50]

Prvním z tekutých forem je roztok. Jedná se o homogenní směs obsahující jednu či více složek rozpuštěných v rozpouštědle. Právě na základě typu tohoto rozpouštědla klasifikujeme roztoky do 3 skupin. První z nich jsou vodné roztoky, které mají jako vehikulum vodu. Dále jsou to hydroalkoholové roztoky, které kromě vody obsahují i alkohol. Příkladem může být tonikum, voda po holení nebo ústní voda. Poslední skupinou jsou pak bezvodé roztoky obsahující jako vehikulum jiná rozpouštědla než je voda. Mohou to být organická rozpouštědla nebo různé oleje, se kterými se můžeme setkat například u přípravků pro péči o nehty [50].

Suspenze je kosmetická forma, kdy je potřeba aplikovat pevné nerozpustné složky, které jsou dispergované v kapalném vehikulu. Podle této kapalně fáze rozlišujeme opět suspenze vodné, hydroalkoholové a bezvodé. Mezi suspenze tak řadíme například antiperspiranty anebo většinu tekuté dekorativní kosmetiky s obsahem pigmentů [50].

Jednou z nejčastějších kosmetických forem je emulze, což je dvoufázový systém tvořený nejméně dvěma kapalinami, kde je jedna rozptýlena v podobě kapiček v té druhé. Pro stabilizaci je potřeba použít emulgátor. Vehikulum je tedy tvořeno složkami vzájemně nemísitelnými nebo mísitelnými pouze z části. Právě díky přítomnosti hydrofilních i lipofilních složek vehikula lze do emulze přidat účinné látky s jakoukoliv polaritou, aniž by se omezila stabilita. Rozlišujeme tak dva základní typy: olej ve vodě (o/v) a voda v oleji (v/o). Na základě viskozity emulze dělíme do dvou skupin, kde tekutou formu představuje lotion a polotuhé jsou pak krémy. Lotion je emulze s nízkou viskozitou, kde je podíl olejové fáze nižší. Nejtypičtějším příkladem jsou různá tělová a pleťová mléka či balzámy. Emulze s vyšší viskozitou jsou krémy. Vehikulum je u krémů tvořeno už větším podílem olejové fáze (obsah vosků a uhlovodíků až do 50 %). Příkladem mohou být klasické krémy, opalovací krémy nebo vlasové kondicionéry [49], [50].

Další kosmetickou formou jsou masti, u kterých je vehikulum tvořeno vysokým podílem olejů, vosků a méně než 20 % vody (popř. vodu neobsahuje). V případě, že obsahuje alespoň nějaké procento vody, řadíme tyto masti také mezi emulze. Jelikož jsou velmi mastné, používají se spíše lokálně, často jako masti pro dětskou kosmetiku. Jako vehikulum jsou masti také využívány pro léčiva [48], [50].

Pasty patří mezi polotuhé kosmetické formy, obsahují tedy vyšší množství pevných částic dispergovaných v mastném vehikulu. Pasty se nejčastěji používají pro ošetření kůže či sliznice, například při vyrážce [50].

Příkladem polotuhé formy je i gel. Ten je tvořen činidlem, které zajišťuje tuhost roztoku a vodným nebo alkoholovým vehikulem. V případě čistících gelů na obličej se mohou přidat i exfoliační perličky. Dalším příkladem jsou ale i gely na holení, stylingové přípravky na vlasy a dezinfekční gely na ruce [50].

Mezi tuhé kosmetické formy patří prášky, kapsle a tuhé tyčinky. Prášky jsou směsí suchých jemných složek, které mohou být volné anebo tlakem lisované. Příkladem obou typů jsou produkty dekorativní kosmetiky. Tuhou formu představují také kapsle, což je z kosmetického hlediska želatinový obal naplněný olejovou fází. Kapsle jsou například různá obličejová séra anebo klasické kuličky do koupele. Posledním typem tuhých forem jsou tuhé tyčinky. Obsahují vosky a menší procento olejů vytvarované do štíhlého válce. Nejčastějším příkladem jsou produkty dekorativní kosmetiky (rtěnky, korektory), ale i deodoranty a některé přípravky na opalování [50].

Kosmetické přípravky však lze klasifikovat i z jiných hledisek než je jejich forma, dělíme je například i dle funkce a místa aplikace. Mezi produkty pro péči o pleť můžeme zařadit přípravky pro čištění a hydrataci pleti, speciální péči (proti akné a stárnutí), ochranu proti slunci, deodoranty a antiperspiranty. Patří sem i dekorativní kosmetika zahrnující rtěnky, oční a obličejový make-up nebo produkty na nehty. Důležité jsou také kosmetické přípravky na vlasy, jako jsou šampony, kondicionéry, ale také stylingové produkty a barvy na vlasy. Dále lze také jmenovat přípravky pro dentální hygienu, prostředky určené k odstranění chloupků (například vosky, pěny na holení), samoopalovací přípravky nebo dětská kosmetika [50].

### **2.7.3 Volba kosmetického vehikula**

Vehikulum je systém tvořící a zajišťující danou kosmetickou formu spolu s bioaktivními či aktivními látkami, které má za úkol dopravit do cílového místa. Aby byla zaručena požadovaná penetrace, tento systém by měl být podobné polarity, jako dané cílové místo. Typem vehikula lze také regulovat rychlost uvolnění a absorpci požadovaných složek. I přes velké množství informací v odborných knihách či lékopisech neexistuje postup, který by určoval přesný výběr kosmetického vehikula pro dané použití. Podle některých odborníků je volba vehikula založena na předchozích poznatcích a doporučení, které byly odvozeny z hlediska několika faktorů. Z velké části hraje určitou roli i marketing [52], [53].

V první řadě je potřeba zvážit typ problému či onemocnění, na které bude daný produkt zaměřen. Dále se vždy berou ohledy na jednotlivé typy pleti, jelikož každá pleť vyžaduje jinou péči. Právě vhodnou volbou složení vehikula lze měnit chemický a fyzikální stav pokožky. Tedy například lipofilnější vehikula obsahující větší podíl tuků jsou vhodná spíše pro suchou pleť. Důležité je i samotné místo aplikace produktu, což je také potřeba zohlednit při volbě vehikula. To je způsobeno různou mírou prostupu látek v závislosti na dané oblasti, v důsledku toho je pak potřeba aplikace jiného množství kosmetického prostředku. V neposlední řadě se při formulaci složení kosmetického vehikula berou v úvahu i okolní faktory jako je stabilita za přesně definovaných podmínek. Pro spotřebitele je také důležitá vzhledová a pocitová stránka produktu [53].

V následující tabulce Tab. 6 jsou uvedeny příklady možností volby vehikula podle místa aplikace a typu pleti v této oblasti.

Tab. 6: Volba vhodného vehikula v závislosti na některých faktorech [53]

Místo aplikace	typ pleti	vehikulum (kosmetická forma)
obličej	suchá	v/o krém
	mastná	roztok, o/v krém
vlasová pokožka	suchá	roztok, v/o krém
	mastná	roztok, gel
tělo	suchá	mast, v/o krém
	mastná	o/v krém
intertriginózní oblasti	vlhká	pasta, o/v krém
nehty	suchá	roztok

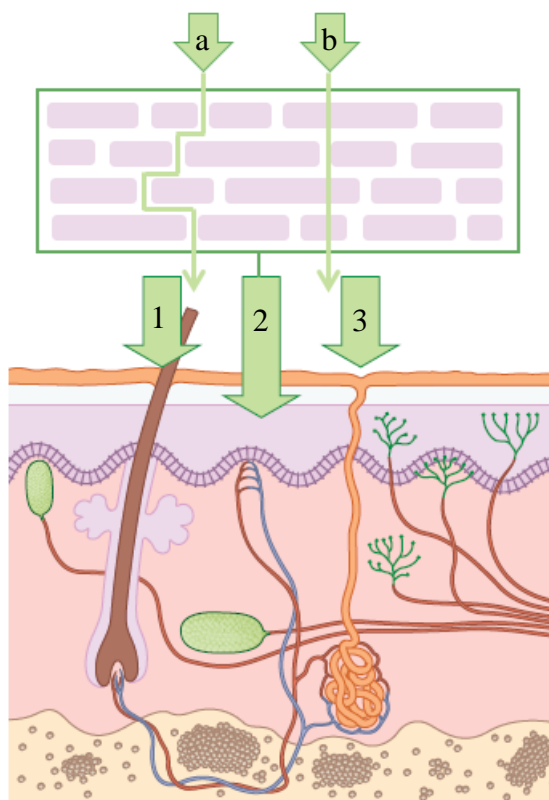
Kromě klasických kosmetických forem (viz kapitola 2.7.2) dochází v posledních letech k vývoji dalších systémů a vehikul. Nejčastěji jsou studovány fosfolipidové přenašeče, lipozomy, mikroemulze, různé nanočástice a další [53].

Pro správnou formulaci kosmetického vehikula je potřeba znát jeho přeměnu v závislosti na různých okolnostech. Některá vehikula se totiž mění nejen časem, ale také při použití. Díky promíchání nebo vypařování některých složek dochází ke změnám ve složení, rozlišujeme tak primární vehikula (ještě balený produkt) a vehikula sekundární (již aplikovaný produkt). V důsledku těchto změn se může postupně lišit (cíleně tak lze i řídit) termodynamickou aktivitu daných látek v rámci formulace kosmetického přípravku, což je rychlost přenosu daných látek z vehikula do pokožky. V případě, že je rozhraní vehikulum-pokožka plně saturováno, je tento transport ve svém maximu. Dle toho lze řídit koncentraci daných látek v závislosti na obsahu těkavých složek [49], [53].

#### 2.7.4 Mechanismus účinku

Existuje několik možností penetrace kosmetických přípravků, přičemž je důležité rozlišovat, zda se jedná o kosmetiku nebo léčivé kosmetické přípravky. Mechanismus účinku těchto produktů se liší především hloubkou prostupu daných látek. První bariéru při prostupu kosmetických přípravků představuje rohová vrstva, kde zůstávají složky běžné kosmetiky a neprostupují již dále. V případě léčivých kosmetických přípravků jsou aktivní látky schopny proniknout do hlubších vrstev. Platí však obecné pravidlo, podle kterého lze určit míru penetrace. U složek s molekulární hmotností do 500 Da lze předpokládat lepší penetraci než u molekul větších, které již procházet nemohou [48], [52].

Možnosti prostupu látek jsou znázorněny na obrázku Obr. 7. Obecně je nejdůležitější transepidermální přenos (2), který může být veden intercelulárně (a) nebo transcelulárně (b). Složky však mohou procházet i potní žlázou (3) nebo vlasovým folikulem (1) a k němu přidruženou mazovou žlázou. Tyto dva případy se na přenosu účastní jen v malé míře, jelikož podíl plochy kůže je mnohem větší, než plocha tvořící potní a mazové žlázy [48], [52].



Obr. 7: Mechanismus prostupu látek [48] – upraveno

Povrch kůže díky svému složení nese záporný náboj. Některé kosmetické přípravky tak mohou být formulovány tak, aby byl jejich účinek založen na tomto principu. Některé produkty tak například obsahují kationtové polymery, které se díky interakcím adsorbují na povrch pokožky. Pro zlepšení prostupu látek lze využít i enhancery, a to chemické (alkoholy, mastné kyseliny, terpeny) i fyzikální (elektroporace, použití mikrojehliček) [52].

### 2.7.5 Formulace kosmetických přípravků

Před samotnou výrobou kosmetických přípravků je nejdříve potřeba vymyslet danou recepturu, přičemž existuje několik možností formulace produktů. Odborníci, kteří se formulační technologií zabývají, musí ovládat nejen kosmetickou chemii, ale i další vědecké oblasti jako je anatomie a fyziologie nebo chemické a fyzikální vlastnosti kosmetických složek [48], [50].

I když má každý kosmetický přípravek své vlastní jasně dané složení i přípravu, jednotlivé formulace stejných typů produktů jsou podobné. To je způsobeno rámcovým složením, což je složení uvádějící složky s jejich maximální koncentrací v kosmetickém přípravku. Příklady rámcového složení formulací některých kosmetických přípravků jsou uvedeny v následující tabulce (viz Tab. 7), kde jsou uvedeny pouze hlavní kategorie základních složek. Přítomny jsou však i specifické složky (rostlinné výtažky) a další přísady, jako jsou například vitamíny, barviva, parfemace nebo UV filtry. Tyto složky však tvoří jen minoritní část přípravku. Jako poslední je v každém přípravku přítomna konzervační přísada, většinou v množství do 2 %. Obsah jednotlivých ingrediencí se volí podle potřeby, přičemž množství vody se vždy dopočítá do 100 %. Z tabulky Tab. 7 je tedy patrné, že složení typově obdobných produktů je velmi podobné, liší se pouze ve zvoleném množství jednotlivých složek a způsobem přípravy [54].

Tab. 7: Rámcová složení [54]

Kosmetický přípravek	složky	obsah [hm. %]
pleťový krém, lotion, gel	voda	do 100
	oleje	30
	zvlhčující látky	20
	etanol	10
	emulgátory	5
přípravek na odličování (včetně dvoufázových produktů)	voda	do 100
	oleje, vosky, tuky	80
	zvlhčující látky	20
	emulgátory	15
	etanol	10
	zahušťovadla	5
tonikum, pleťová voda	voda	do 100
	etanol	70
	zvlhčující látky	25
	oleje	5
	emulgátory	5

V první řadě se tedy pro danou bioaktivní či aktivní látku zvolí vhodné vehikulum na základě daných kritérií. Postup přípravy vehikula se odvíjí dle typu. Roztoky se připravují jednoduše rozpuštěním pevných složek v daném rozpouštědle, přičemž těkavé látky se přidávají až na konci, aby se zamezilo ztrátám. Nejčastější postup přípravy emulze je horká metoda. Nejdříve se zahřívá zvláště hydrofilní i lipofilní fáze, poté se za stálého míchání smíchají a pokračuje se v mísení až do vychladnutí. U bezvodých mastí, které se již nepovažují za emulze, postačí pouze smíchat olejové složky. Pevné ingredience pro přípravu past jsou dispergované v olejové fázi. Formulace suspenzí patří mezi časově náročnější procedury, která začíná přípravou kapalně fáze a zmenšováním daných částic. Poté se tyto částice navlhčí malým množstvím připraveného roztoku tak, aby byla vytvořena jednotná koncentrovaná suspenze. Až potom lze pomalu přidat i zbytek tekuté fáze. Zdlouhavá příprava je díky počáteční hydrataci zahušťovadla také u gelů. Poté se přidají ostatní složky. Pro přípravu obou typů prášku postačí pouze rovnoměrně smíchat jednotlivé složky, přičemž pro lisované prášky je poté potřeba použít tlak. Kapsle jsou složeny ze dvou želatinových částí, po jejichž přípravě se do nich spojením uzavírá daná olejová fáze, někdy za pomoci pásku. Tuhé tyčinky se vyrábějí technikou tvarování. Vosky a oleje se roztaví a smíchají s dalšími složkami, poté se ihned nalijí do požadované kovové či plastové formy a nechají se vychladnout [50].

## **2.8 Metody analýzy kosmetických přípravků**

Pro analýzu kosmetických přípravků a jejich složek lze využít celou řadu metod, mezi které patří například klasické analytické metody nebo metody zkoušení. Standardně však k nejdůležitějším patří mikrobiologické testy, které jsou také přesně stanoveny českými normami [55], [56].

### **2.8.1 Analytické instrumentální metody**

Instrumentální metody jsou postupy analytické chemie, kterými lze zjistit chemické složení daného vzorku, umožňují nám kvalitativní i kvantitativní analýzu. Vyhláška č. 494/2005 Sb. stanovuje analytické metody pro kontrolu složení kosmetických prostředků. Využívají se metody spektrofotometrické, chromatografické, titrační a další [55], [57].

Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-VIS spektrofotometrie) patří mezi spektroskopické metody využívající optické vlastnosti chemických látek. Během analýzy jsou sledovány změny při interakci molekul se zářením, přičemž tyto molekuly absorbují záření v rozmezí 200–800 nm. Kvalitativní analýza, tedy identifikace dané látky, je založena na porovnání spektra se standardem. Kvantifikaci vzorku umožňuje platnost Lambert Beerova zákona, podle něhož je absorbance závislá na koncentraci vzorku, molárním absorpčním koeficientu a tloušťce kyvety. Instrumentace spektrofotometru je rozdělena do čtyř hlavních částí – systém emisní, disperzní, absorpční a fotometrický. Jako zdroj záření se používá wolframová lampa, vodíková nebo deuteriová výbojka. Světlo je poté soustředěno přes monochromátor na kyvetu se vzorkem, resp. s referenčním vzorkem. Na konec je umístěn detektor, nejčastěji se využívá fotodioda nebo fotoelektrický násobič. Signál pak zpracuje vyhodnocovací systém [55].

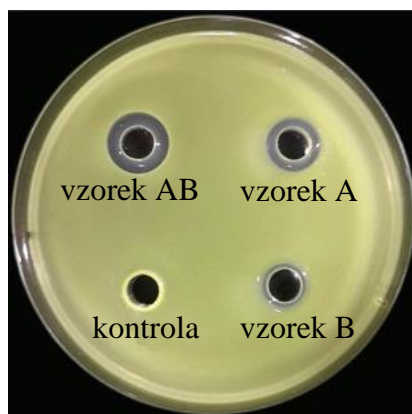


Chromatografie je analytická metoda, která je obecně založena na rovnovážném dělení látek mezi mobilní a stacionární fází. Jednotlivá eluční data (retenční data) po srovnání se standardy se využívají pro kvalitativní analýzu. Nejčastěji využívanou metodou kvantifikace je pak integrace plochy pod křivkou, jelikož je tato hodnota závislá na koncentraci. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) využívá jako mobilní fázi kapalinu. Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí. Základní součástí je zásobník mobilní fáze, odplyňovač a směšovač v případě gradientové eluce. Následuje vysokotlaké čerpadlo a dávkovací smyčka, odkud je mobilní fáze i vzorek veden do předkolony, poté do samotné kolony plněné vhodným sorbentem. Výstup kolony vede přímo do detektoru, mezi ty základní u kapalinové chromatografie patří například fotometrický, refraktometrický, vodivostní nebo polarografický. Na konci celého systému je opět vyhodnocovací zařízení [55].

### 2.8.2 Antimikrobiální testy

Mezi základní mikrobiologické zkoušky patří antimikrobiální testy citlivosti bakterií. Těmito metodami lze zjistit kvalitativní i kvantitativní údaj. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejmenší koncentrace dané antimikrobiální látky, která inhibuje růst kultury. Pro získání těchto informací se nejčastěji využívá difúzní nebo diluční test [25].

Difúzní diskový test poskytuje pouze nepřímou hodnotu MIC a musí být standardizován. Do Petriho misky je nalito médium, do kterého je zaočkována daná kultura. Poté jsou aplikovány disky s antibiotikem, popř. se vytvoří v agaru jamky, do nichž se pipetuje daná antimikrobiální látka (znázorněno na Obr. 8). Následuje 18–24 hodin inkubace, po které se měří průměr inhibiční zóny [25].



Obr. 8: Difúzní diskový test [58] – upraveno

Jamkový diluční test je přímá metoda, která se provádí na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Do těchto jamek se pipetuje vzorek antimikrobiální látky a vhodně zředěná daná kultura. Po inkubaci se antimikrobiální účinek vyhodnocuje buď podle viditelné inhibice růstu kultury, nebo častěji fotometricky. V tomto případě se měří v daném intervalu zákal v jamce se vzorkem, a to se porovná s kontrolní jamkou [25].

### **3 CÍLE PRÁCE**

Cílem této diplomové práce, týkající se technického konopí a jeho využití v kosmetice proti akné, je vypracování následujících dílčích úkolů:

- 1) vypracování literární rešerše shrnující aktuální informace o aktivních látkách používaných v přípravcích proti akné, včetně nároků na výběr správného kosmetického vehikula pro lepší biologickou dostupnost účinné látky
- 2) stanovení a charakterizace aktivních látek z vybraných částí rostliny konopí
- 3) návrh a testování vybraných kosmetických výrobků proti akné s obsahem aktivních látek z konopí.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 4.1.1 Chemikálie

ABTS, Sigma Aldrich (SRN)  
Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade, Sigma-Aldrich (SRN)  
Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)  
Etanol, p.a., LachNer (ČR)  
Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (SRN)  
Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)  
Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)  
Kanabidiol CBD, Sigma Aldrich (SRN)  
Kanabigerol CBG, Sigma Aldrich (SRN)  
Kanabichromen CBC, Sigma Aldrich (SRN)  
Kanabinol CBN, Sigma Aldrich (SRN)  
Katechín, Sigma Aldrich (SRN)  
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SRN)  
Methanol pro HPLC, VWR Chemicals BDH PROLABO (GB)  
Octan amonný, p.a., Lachema (ČR)  
Peroxodisíran draselný, p.a., Sigma Aldrich (SRN)  
Trolox, Sigma Aldrich (SRN)  
Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)

Allantoin, Acetrade (ČR)  
Bambucké máslo, Aromaterapeutická KH a.s. (ČR)  
Cetearylalkohol, Cetylalkohol Miča a Harašta s.r.o., Blansko (ČR)  
Euxyl® PE 9010, Schülke & Mayr GmbH (SRN)  
Fenoxyetanol, Acetrade (ČR)  
Glycerin bezvodý, p.a., LachNer (ČR)  
Nikotinamid, Acetrade (ČR)  
Polysorbát 80, Dr. Kulich Pharma, s. r. o. (ČR)  
Saboderm TCC, Acetrade (ČR)  
Sabonal C1618 50/50, Acetrade (ČR)  
Sabowax GMS, Acetrade (ČR)  
Sabowax HCO, Acetrade (ČR)  
Trietanolamin 99%, Acetrade (ČR)

Agar Powder, Himedia (IND)  
BHI médium, Himedia (IND)  
Glukóza, p.a., LachNer (ČR)  
Kvasničný autokatalyzát, Himedia (IND)  
LB médium, Sigma-Aldrich (SRN)  
NB médium, Himedia (IND)  
Pepton, Himedia (IND)

#### 4.1.2 Přístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)  
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)  
Kolona Hypercarb 3  $\mu$ , 2,1 x 100 mm, Agilent Technologies (USA)  
Kolona Kinetex 2,6  $\mu$  C18, 4,6 x 150 mm, Agilent Technologies (USA)  
Kolona Kinetex 5  $\mu$  C18, 4,6 x 150 mm, Agilent Technologies (USA)  
Laminární box Airstream, ESCO (SN)  
Magnetická míchačka, Lavat (ČR)  
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)  
Předvážky Scout Pro, OHAUS (USA)  
Sestava HPLC/PDA/MS, Thermo Finnigan SURVEYOR, Thermo Fischer (USA)  
Spektrofotometr VIS, Helios  $\delta$ , Unicam (GB)  
Sušárna, Memmert GmbH + Co. KG (SRN)  
Temperovaná třepačka HeidolphUnimax 1010, Labicom (ČR)  
Ultrazvuková lázeň PS 02000 (ČR)  
Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)  
Vortex, TK35, Kartell spa (USA)

Dále byly použity automatické pipety různých objemů a běžné laboratorní sklo a pomůcky.

#### 4.2 Použité mikroorganismy

Pro antimikrobiální testy byly použity dva zástupci grampozitivní bakterie, jedna gramnegativní bakterie a jedna kvasinka.

Pro kultivaci bylo vždy použito 50 ml daného tekutého média v Erlenmeyerově baňce, které bylo zaočkováno příslušnou kulturou z dlouhodobě uchovávané kultury. Pouze v případě *Propionibacterium acnes* byla kultura kultivována v centrifugační zkumavce naplněné téměř k uzávěru, aby byly zajištěny anaerobní podmínky. Kultivace ve všech případech probíhala na temperované třepačce při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté bylo inokulum použito pro antimikrobiální testy. Při přípravě médií i během manipulace s mikroorganismy probíhala práce vždy ve sterilním boxu.

Pro gramnegativní bakterii *Escherichia coli* CCM 7395 (LB médium) a pro obě grampozitivní bakterie *Propionibacterium acnes* CCM 3437 (BHI médium) a *Micrococcus luteus* CCM 1569 (NB médium) byla použita komerční média (viz Tab. 8), která byla připravena dle návodu na obalu. Pro přípravu pevného média byl přidán agar o koncentraci 20 g/l.

Kvasinka *Candida glabrata* CCM 8270 byla kultivována v tekutém i pevném YPD médiu, jehož složení je uvedeno v následující tabulce Tab. 8. Do pevného média byl opět ještě navíc přidán agar o koncentraci 20 g/l.

V následující tabulce (Tab. 8) je uvedeno složení komerčních médií, ale i YPD média, které bylo připraveno zvlášť.

Tab. 8: Složení médií

Médium	mikroorganismus	složka	koncentrace [g/l]
BHI	<i>Propionibacterium acnes</i>	telecí mozek	200
		hovězí srdce	250
		pepton	10
		dextróza	2
		NaCl	5
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
NB	<i>Micrococcus luteus</i>	pepton	10
		hovězí extrakt	10
		NaCl	5
LB	<i>Escherichia coli</i>	trypton	10
		kvasniční extrakt	5
		NaCl	10
YPD	<i>Candida glabrata</i>	pepton	10
		glukóza	40
		kvasničný autokatalyzát	20

### 4.3 Použité odrůdy konopí

Pro tuto diplomovou práci byly použity dvě odrůdy konopí setého, které byly vypěstovány v Kostelní Myslové u Telče. První sklizeň rané odrůdy Finola proběhla 9. 8. 2017. Druhá odrůda Bialobřežského konopí byla sklizena 21. 9. 2017.

### 4.4 Příprava konopných vzorků

Jako vzorky byly použity konopné extrakty a kosmetické přípravky z nich vyrobené (pleťové mléko, micelární voda a pleťové tonikum). Dále byly zakoupeny výrobky kosmetické značky Bione Cosmetics řady Cannabis.

#### 4.4.1 Extrakty

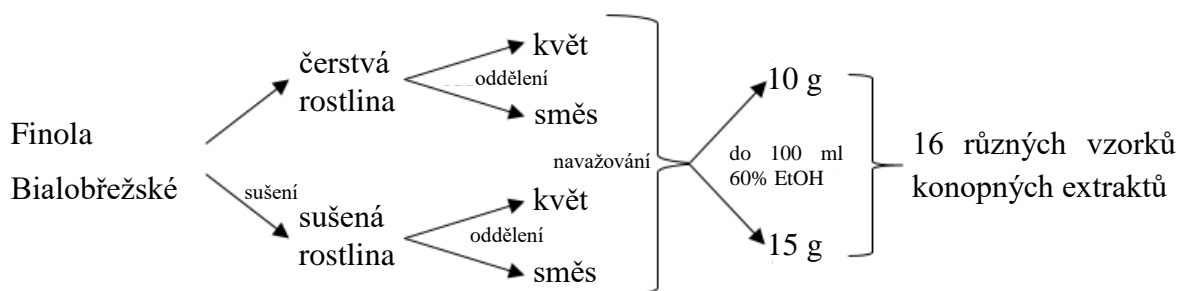
Pro přípravu extraktů čerstvého květu byly nejdříve odděleny květy od ostatních částí rostliny. Poté bylo pro první koncentraci naváženo 10 g květů a pro druhou koncentraci 15 g. Každá navážka byla poté zalita 100 ml 60% roztoku etanolu pro UV-VIS. Pro vzorek extraktu čerstvé směsi byly použity všechny části rostliny, tedy květy, listy, semena a stonek. Další postup byl stejný jako u extraktů květu. Poté byly baňky s extrakty obaleny alobalem a ponechány 6 dní extrahovat ve tmě. Nakonec byly všechny extrakty přefiltrovány přes gázu a uskladněny v tmavých láhvkách.

Pro přípravu extraktů sušeného konopí byly obě dvě odrůdy nejdříve sušeny v sušárně po dobu 4 dnů při 40 °C (viz Obr. 9). Součástí postupu práce bylo také gravimetrické stanovení obsahu vody v konopí, které bylo zjištěno vážením rostliny před a po sušení. Z rozdílu těchto hodnot byl zjištěn procentuální obsah vody v čerstvém konopí, což bylo použito při dalších stanoveních pro přepočet. Příprava extraktů sušeného květu a směsi byl stejný jako u extraktů čerstvého konopí zahrnující obě koncentrace.



Obr. 9: Proces sušení Finoly (čerstvá vlevo, sušená vpravo)

Postup přípravy extraktů z čerstvých i sušených rostlin obou různých koncentrací byl pro Finolu i Bialobřežské stejný, přičemž obě dvě odrůdy technického konopí byly zpracovány do 24 hodin po sklizni. Přehledné schéma postupu výroby všech vzorků konopných extraktů je uvedeno na následujícím obrázku Obr. 10.



Obr. 10: Schéma přípravy vzorků konopných extraktů

#### 4.4.2 Plet'ové mléko

Nejdříve byly do kádinky naváženy suroviny olejové fáze. V jiné kádince pak byla připravena fáze vodná. Poté byly obě kádinky umístěny do vodní lázně vyhřáté na 80 °C. Po zahřátí a rozpuštění obou fází byla pomalu za stálého míchání přidávána olejová fáze do fáze vodné. Poté byla emulze míchána až do zchladnutí (přibližně hodinu), přičemž byla průběžně měněna rychlost otáček míchadla i jeho pozice. Také byl připraven vzorek základu pleťového mléka bez přidání konopného extraktu (místo něho byla přidána destilovaná voda). Hmotnost jednoho vzorku pleťového mléka byla 50 g, takže konkrétní hmotnosti jednotlivých surovin obou fází byly přepočítány podle procentuálního obsahu uvedeného v následující tabulce Tab. 9.

Tab. 9: Receptura pro konopné mléko

Vodná fáze		Olejová fáze	
surovina	obsah [%]	surovina	obsah [%]
destilovaná voda	80	sabowax HCO	1
glycerol	3,3	bambucké máslo	5
konopný extrakt	4	saboderm TCC	1
fenoxyetanol	0,5	cetearyl alkohol	3
trietanolamin	0,2	sabonal C1618 50/50	1
		sabowax GMS	1

#### 4.4.3 Micelární voda

Do kádinky byl navážen allantoin a nikotinamid, poté destilovaná voda s glycerolem. Po promíchání byl přidán konopný extrakt. Jako poslední byl přidán euxyl® PE 9010 a polysorbát 80, poté byla směs promíchána. Připraven byl i vzorek základu micelární vody bez přidání konopného extraktu (opět přidána jen destilovaná voda). Hmotnost jednoho vzorku micelární vody byla 100 g, procentuální zastoupení surovin jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Receptura pro konopnou micelární vodu

Surovina	Obsah [%]
allantoin	0,1
nikotinamid	0,9
destilovaná voda	95
glycerol	1
konopný extrakt	1
euxyl® PE 9010	1
polysorbát 80	1

#### 4.4.4 Pleťové tonikum

Pro výrobu konopného pleťového tonika byl nejdříve do kádinky navážen allantoin a nikotinamid, ke kterým byla poté přidána destilovaná voda, etanol a glycerol. Směs byla promíchávána až do rozpuštění pevného podílu. Následně byl přidán konopný extrakt. Nakonec byl dovážen ještě euxyl® PE 9010 a polysorbát 80. Směs byla poté znovu promíchána. Také byl připraven vzorek základu tonika bez přidání konopného extraktu, kde místo něho byla přidána destilovaná voda. Hmotnost jednoho vzorku pleťového tonika byla 100 g, přičemž procentuální zastoupení jednotlivých surovin jsou uvedeny v tabulce níže (viz Tab. 11).

Tab. 11: Receptura pro konopné pleťové tonikum

Surovina	Obsah [%]
allantoin	0,1
nikotinamid	0,9
destilovaná voda	86
etanol	7
glycerol	3
konopný extrakt	1
euxyl® PE 9010	1
polysorbát 80	1

#### 4.4.5 Zakoupené konopné přípravky

Pro srovnání připravených konopných výrobků s přípravky běžně dostupnými na českém trhu byly zakoupeny tři výrobky značky Bione (Obr. 11).



Obr. 11: Konopná řada kosmetických přípravků značky Bione Cosmetics



- **Čistící odličovací plet'ové mléko Cannabis**

*Složení:* aqua, ethylhexyl stearate, glycerin, panthenol, cannabis sativa seed oil, cannabis sativa leaf extract, allantoin, inositol, tocopherol, capryloyl glycin, sorbitan caprylate, parfum, sodium hydroxide, acrylates/vinyl isodecanoate crosspolymer, phenoxyethanol, sodium cocoyl glutamate, xanthan gum.

- **Micelární plet'ová voda Cannabis**

*Složení:* aqua, panthenol, capryloyl glycine, glycerin, cannabis sativa leaf extract, allantoin, azelaic acid, carnosine, niacinamide, propanediol, PEG-40 hydrogenated castor oil, sodium hydroxide, sorbitan caprylate, ethylhexylglycerin, parfum, potassium sorbate.

- **Čistící odličovací plet'ové tonikum Cannabis**

*Složení:* aqua, alcohol denat, glycerin, panthenol, capryloyl glycine, inositol, cannabis sativa leaf extract, propanediol, parfum, allantoin, lactic acid, ethylhexylglycerin, PEG-40 hydrogenated castor oil, triethyl citrate, potassium sorbate, phenoxyethanol.

#### **4.5 Stanovení celkových polyfenolů**

Do zkumavky byl nejdříve napipetován 1 ml zředěného Folin-Ciocaltevova činidla v poměru 1:9 s destilovanou vodou. Následně byl přidán 1 ml destilované vody a 50  $\mu$ l připraveného vzorku. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , zkumavka byla promíchána a ponechána 15 minut stát. Obsah přítomných polyfenolů byl poté změřen spektrofotometricky při  $\lambda=750$  nm. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem, pouze místo vzorku byl použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS. Pro kalibraci byla jako standard použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí 0–0,5 mg/ml.

#### **4.6 Stanovení celkových flavonoidů**

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5%  $\text{NaNO}_2$ . Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Následně bylo přidáno 0,2 ml 10%  $\text{AlCl}_3$ , promícháno a opět ponecháno 5 minut stát. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml 1M  $\text{NaOH}$  a 1 ml destilované vody. Tato směs byla ještě jednou promíchána a ponechána 15 minut stát. Obsah přítomných flavonoidů byl zjištěn spektrofotometricky při  $\lambda=510$  nm. Slepý vzorek byl připraven stejným postupem, pouze místo vzorku byl použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS. Jako standard byl použit katechín v koncentračním rozmezí 0–0,3 mg/ml.

#### **4.7 Stanovení antioxidační aktivity**

Před samotným měřením byl připraven kationt-radikál  $\text{ABTS}^{++}$  v 10 ml odměrné baňce tak, že byl ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)) rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci  $c=7$  mM a k němu byl přidán peroxodisíran draselný o koncentraci  $c=2,45$  mM. Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a obalena alobalem. Následně byla ponechána stát ve tmě při pokojové teplotě 12 hodin. Těsně před analýzou byl roztok  $\text{ABTS}^{++}$  zředěn etanolem pro UV-VIS na absorbanci  $A=0,700$  při  $\lambda=734$  nm.

Při analýze vzorku byl do zúžené kyvety napipetován 1 ml upraveného ABTS<sup>•+</sup> a 10 µl připraveného vzorku. Po promíchání byla měřena absorbance po uplynutí 10-ti minut → A<sub>1</sub>. Jako substrát byl použit 1 ml upraveného ABTS<sup>•+</sup> a 10 µl destilované vody, přičemž absorbance byla zaznamenána ihned po promíchání → A<sub>0</sub>. Absorbance vzorku i substrátu byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce λ=734 nm, přičemž výsledná absorbance byla vypočítána pomocí vztahu:

$$A = A_0 - A_1 \quad (1)$$

Při měření kalibrace byl postup obdobný jako u vzorku. Nejdříve byl připraven zásobní roztok Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) rozpuštěného pomocí 60% roztoku etanolu čistoty pro UV-VIS. Koncentrační rozmezí měřeného standardu Troloxu bylo 0–400 µg/ml. Pro měření absorbance koncentrační řady byl napipetován 1 ml upraveného ABTS<sup>•+</sup> a 10 µl vzorku dané koncentrace standardu Troloxu. Při měření substrátu byl postup stejný, pouze místo vzorku byl použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS. Absorbance byly měřeny opět při vlnové délce λ=734 nm a výsledná absorbance byla vypočítána podle uvedené rovnice (1).

#### 4.8 Stanovení kanabinoidů pomocí HPLC

Vzorky extraktů sušeného konopí byly zředěny a přefiltrovány přes jednorázový filtr a následně byly ihned analyzovány pomocí HPLC.

Pro stanovení kanabinoidů byly nastaveny gradientové podmínky eluce (uvedeny v Tab. 12) za použití kolony Kinetex 5 µ C18, 4,6 x 150 mm značky Agilent Technologies. Mobilní fáze A byl čistý metanol pro HPLC a mobilní fáze B byla Milli-Q voda. Rychlost průtoku byla 800 µl/min, objem dávkovací smyčky 20 µl, teplota separace 40 °C. Analýza byla zakončena spektrofotometrickou detekcí nastavenou pro vlnové délky při maximech daných píků standardů, kde λ<sub>1</sub>=210 nm, λ<sub>2</sub>=220 nm, λ<sub>3</sub>=280 nm. Pro kalibraci byl použit směsný roztok kanabinoidů (CBC, CBD, CBG a CBN) v koncentračním rozmezí 0–25 µg/ml.

Tab. 12: Podmínky eluce

Čas [min]	Mobilní fáze [%]	
	A	B
0	80	20
4	80	20
9	100	0
10	100	0
11	80	20
13	80	20

## 4.9 Stanovení antimikrobiálního účinku

Antimikrobiální účinek vzorků extraktů konopí, připravených i zakoupených kosmetických přípravků byl stanoven za použití bakterií *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a kvasinky *Candida glabrata*.

### 4.9.1 Difúzní agarový test

Pro tuto metodu byly nejdříve připraveny Petriho misky s příslušným médiem s přídavkem agaru (NB, LB a YPD média). Tyto misky byly poté sterilně zaočkovány 24 hodinovou kulturou vybraných mikroorganismů (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*). Poté byly do tuhého média vytlačeny jamky, do kterých se následně pipetovalo 50 µl vzorku konopných extraktů, jednotlivých kosmetických výrobků (včetně čistého základu), blanku 60% etanolu a 0,1% allantoinu. Následovalo 24 hodin kultivace při 37 °C. Test byl vyhodnocen změřením velikosti inhibiční zóny okolo jamek.

### 4.9.2 Diluční jamkový test

Tato metoda byla provedena na mikrotitrační destičce, kam bylo nejdříve do jednotlivých jamek napipetováno 75 µl všech vzorků konopných extraktů, kosmetických přípravků (včetně čistého základu) a blanky (čistá kultura *Propionibacterium acnes*, 60% etanol, 0,1% allantoin). Následně bylo přidáno 225 µl vhodně zředěné 24 hodinové kultury *Propionibacterium acnes* a ihned byla změřena absorbance (zákal) pomocí ELISA readeru při vlnové délce  $\lambda=630$  nm. Mikrotitrační destička pak byla kultivována při 37 °C a po 24 hodinách byla opět zaznamenána absorbance.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Připravené konopné vzorky

Dle postupu uvedeném v kapitole 4.4 byly připraveny vzorky konopných extraktů a kosmetických přípravků s přídavkem konopného extraktu.

#### 5.1.1 Konopný extrakt

Konopné extrakty byly připraveny ze dvou odrůd konopí setého (Finola, Bialobřežské), které byly vypěstovány v Kostelní Myslové. Dále byly zpracovány dle schématu (viz Obr. 10) v podkapitole 4.4.1, takže bylo připraveno celkem 16 různých konopných extraktů, které byly uskladněny v tmavých láhvích (viz Obr. 12A). Extrakty pak byly zvlášť analyzovány z hlediska obsahu polyfenolů, flavonoidů, kanabinoidů, dále u nich byla zjištěna antioxidační aktivita a antimikrobiální účinek. Také byly přidávány do připravených kosmetických přípravků.

#### 5.1.2 Plet'ové mléko

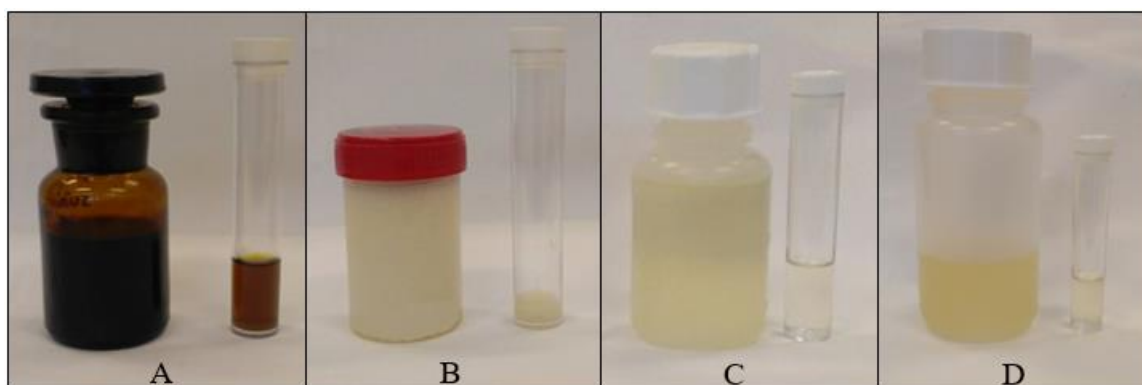
Konopné plet'ové mléko bylo připraveno dle postupu v kapitole 4.4.2, přičemž byl přidáván vzorek konopného extraktu. Použity byly však jen vzorky ze sušeného konopí, jelikož obsahovaly více účinných látek. Plet'ová mléka byla uskladněna ve tmě v plastových kelímcích (ukázka viz Obr. 12B).

#### 5.1.3 Micelární voda

Micelární voda s přídavkem extraktů sušeného konopí bylo připraveno podle uvedeného postupu (viz 4.4.3). Všechny vzorky micelárních vod pak byly uskladněny ve tmě v plastových lahvičkách (100 ml) jako je na obrázku Obr. 12C.

#### 5.1.4 Plet'ové tonikum

Konopné plet'ové tonikum bylo připraveno dle postupu v kapitole 4.4.4 s tím, že byl přidán vzorek extraktu (opět pouze sušené konopí). Konopné plet'ové tonikum bylo taktéž uskladněno ve tmě v plastové lahvičce o objemu 250 ml (viz Obr. 12D).



Obr. 12: Připravené konopné extrakty a kosmetické přípravky

## 5.2 Celkové polyfenoly

Množství celkových polyfenolů ve všech vzorcích extraktů bylo stanoveno podle postupu uvedeného v kapitole 4.5. Výsledné absorbance byly vypočteny jako aritmetický průměr naměřených hodnot s tím, že pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát. Koncentrace celkových polyfenolů ve vzorku pak byla získána po dosazení průměrné absorbance do rovnice přímky kalibrační křivky, která je uvedena v poslední kapitole (viz Příloha 1). Rovnice kalibrace pro celkové polyfenoly je  $y = 0,8654x$ .

### 5.2.1 Extrakty

U vzorků extraktů z čerstvého konopí byla výsledná koncentrace polyfenolů pro doplnění přepočítána na 1 g sušené rostliny (přepočteno dle výsledků gravimetrického měření popsaného v kapitole 4.4). Všechny získané hodnoty, včetně směrodatné odchylky vypočtené funkcí Excelu, jsou uvedeny v Tab. 13. Dvě rozdílné koncentrace konopí (navážené množství rostliny) specifikovaných v kapitole 4.4.1 jsou zde vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

Tab. 13: Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích extraktů

Odrůda			FINOLA		BIALOBŘEŽSKÉ	
úprava	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	koncentrace		koncentrace	
			[mg/ml]	[mg/g]	[mg/ml]	[mg/g]
čerstvá	10/100	květ	0,90 ± 0,17	9,03 ± 1,69	1,16 ± 0,04	11,56 ± 0,35
		směs	0,55 ± 0,13	5,51 ± 1,30	0,99 ± 0,11	9,88 ± 0,00
	15/100	květ	1,46 ± 0,25	9,75 ± 1,64	2,01 ± 0,21	13,42 ± 1,42
		směs	1,18 ± 0,09	7,86 ± 0,62	1,42 ± 0,15	9,49 ± 1,00
sušená	10/100	květ	1,87 ± 0,12	18,72 ± 1,14	1,96 ± 0,01	19,59 ± 0,08
		směs	1,33 ± 0,13	14,10 ± 1,31	1,39 ± 0,22	13,87 ± 2,29
	15/100	květ	2,46 ± 0,13	16,90 ± 0,85	3,35 ± 0,04	22,34 ± 0,28
		směs	1,94 ± 0,09	12,90 ± 0,16	2,04 ± 0,08	13,60 ± 0,27

Z uvedené tabulky (viz Tab. 13) je zřejmé, že větší množství polyfenolů je v extraktech sušeného konopí. To je patrně způsobeno tím, že množství aktivních látek se zvyšuje během sušení, kdy dekarboxylací vznikají další biologicky aktivní látky. Z tohoto důvodu byly srovnávány zvlášť extrakty z čerstvého konopí a zvlášť ze sušeného konopí. Jednotlivé vzorky byly porovnávány z hlediska typu extraktu a v závislosti na odrůdě. Srovnání dle koncentrace (naváženého množství) bylo pouze kontrolní, jelikož ve všech případech s vyšší koncentrací samozřejmě množství polyfenolů vzrostlo.

V první řadě jsou zde extrakty z čerstvé konopné směsi složené nejen z květů, ale i listů, semen a stonku, což jsou části rostliny méně bohaté na biologicky aktivní látky. Proto dle očekávání jsou vyšší hodnoty u extraktů čerstvého květu, jelikož obsahují více těchto látek, tedy i polyfenolů (viz Obr. 13).

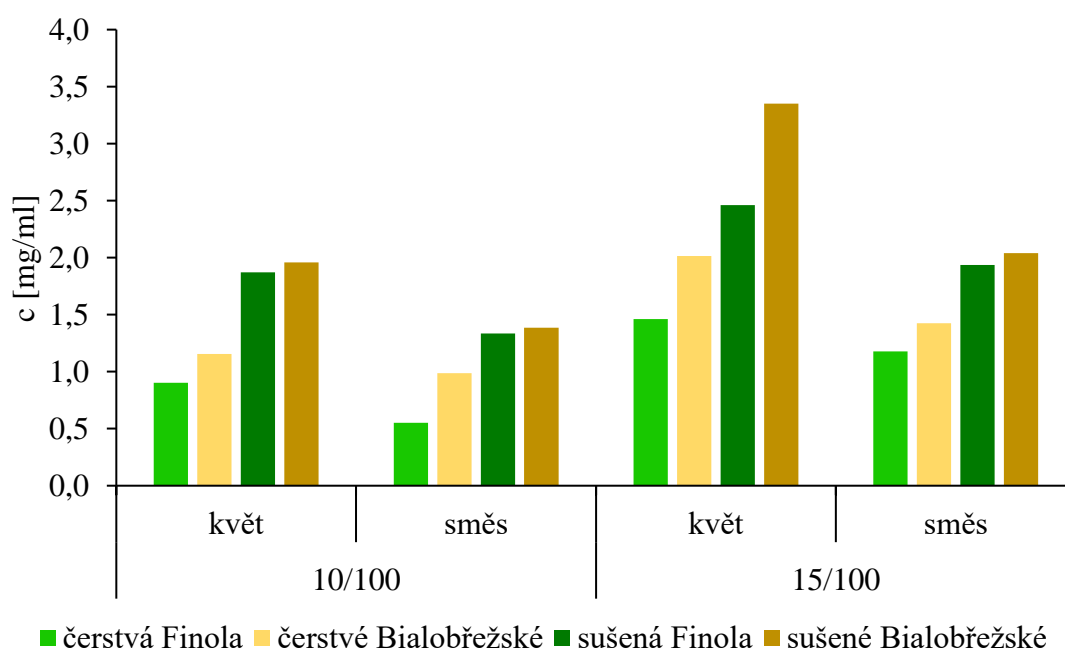
Vzorky byly dále srovnávány podle odrůdy. Množství polyfenolů je ve všech případech vždy vyšší u odrůdy Bialobřežské. Tato odrůda je oproti Finole později sklizená, což mohlo hrát roli během růstu rostliny, ale také při syntéze obsahových látek. Také se u Finoly a Bialobřežského jedná o odrůdy speciálně vyšlechtěné, tudíž se množství přítomných látek může lišit.

Množství celkových polyfenolů bylo vyjádřeno v ekvivalentech kyseliny Gallové, která byla použita jako standard při měření kalibrační závislosti. Tato kyselina patří mezi zástupce polyfenolů. Hodnoty obsahu polyfenolů přítomných v extraktech čerstvého konopí obou odrůd se pohybují v rozmezí 0,55–2,01 mg/ml extraktu (resp. 5,51–13,42 mg/g rostliny). Všechny konkrétní hodnoty jsou uvedeny výše v Tab. 13.

U extraktů připravených ze sušených rostlin byl obsah polyfenolů celkově vyšší, než u čerstvého konopí, což je tedy pravděpodobně způsobeno zmíněnou dekarboxylací obsažených látek, které se poté mění na účinnější formy. Také některé látky přímo vznikají až po tepelné úpravě či po působení kyslíku. Nejvyšší hodnota byla  $3,35 \pm 0,04$  mg/ml extraktu (resp.  $22,34 \pm 0,28$  mg/g rostliny).

Stejně jako u extraktů čerstvého konopí, je obsah polyfenolů vyšší u extraktů konopného květu, protože se v této části rostliny nachází větší množství aktivních látek ve srovnání s ostatními segmenty konopí.

Zároveň můžeme opět porovnat obě odrůdy, přičemž vyšší množství je znovu u konopí Bialobřežského (viz Obr. 13). Ovšem rozdíl oproti Finole již není tak markantní jako u extraktů čerstvého konopí.

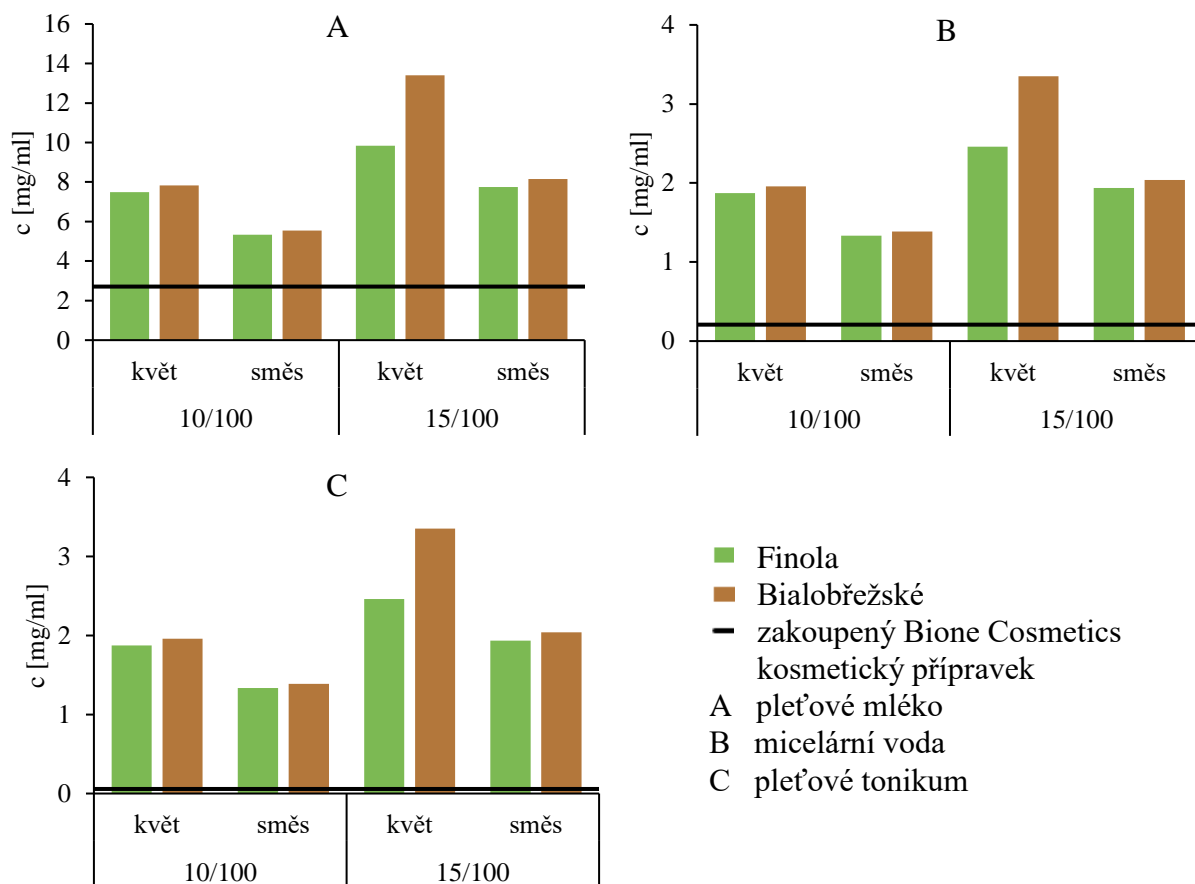


Obr. 13: Obsah celkových polyfenolů v konopných extraktech

### 5.2.2 Kosmetické přípravky

Množství celkových polyfenolů v připravených kosmetických přípravcích bylo pouze vypočteno, jelikož bylo známo množství přidávaných extraktů ze sušeného konopí. Pro srovnání byly pouze stanoveny celkové polyfenoly v zakoupených kosmetických přípravcích.

Množství polyfenolů v mg na ml přípravku je znázorněno na Obr. 14, přičemž vodorovná čára zde značí dané množství v zakoupeném kosmetickém přípravku. Jak je vidět, obsah polyfenolů je vyšší v připravených produktech než v těch zakoupených. Pouze u pleťového mléka je tato hodnota vyšší, patrně kvůli tomu, že zakoupený přípravek obsahuje konopný extrakt i olej.



Obr. 14: Přehled obsahu polyfenolů v kosmetických přípravcích

### 5.3 Celkové flavonoidy

Množství celkových flavonoidů ve všech vzorcích extraktů bylo stanoveno podle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Výsledné absorbance byly vypočteny jako aritmetický průměr naměřených hodnot, s tím, že pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát. Koncentrace celkových flavonoidů ve vzorku byla získána po dosazení průměrné absorbance do rovnice přímky kalibrační křivky, která je uvedena v poslední kapitole (viz Příloha 2). Rovnice kalibrace pro celkové flavonoidy je  $y = 2,6240x$ .

#### 5.3.1 Extrakty

Výsledná koncentrace flavonoidů ve vzorcích čerstvého konopí byla opět pro doplnění přepočítána na 1 g sušené rostliny (přepočteno dle výsledků gravimetrického měření popsaného v kapitole 4.4). Všechny získané hodnoty, včetně směrodatné odchylky vypočtené funkcí Excelu, jsou uvedeny v Tab. 14. Dvě rozdílné koncentrace konopí (navážené množství rostliny) specifikovaných v kapitole 4.4.1 jsou zde vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

Tab. 14: Obsah celkových flavonoidů ve vzorcích extraktů

Odrůda			FINOLA		BIALOBŘEŽSKÉ	
úprava	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	koncentrace		koncentrace	
			[mg/ml]	[mg/g]	[mg/ml]	[mg/g]
čerstvá	10/100	květ	$0,52 \pm 0,02$	$5,21 \pm 0,18$	$0,54 \pm 0,03$	$5,43 \pm 0,25$
		směs	$0,36 \pm 0,01$	$3,61 \pm 0,13$	$0,39 \pm 0,02$	$3,91 \pm 0,19$
	15/100	květ	$0,63 \pm 0,03$	$4,22 \pm 0,22$	$0,79 \pm 0,04$	$5,28 \pm 0,23$
		směs	$0,56 \pm 0,02$	$3,73 \pm 0,14$	$0,60 \pm 0,02$	$4,00 \pm 0,14$
sušená	10/100	květ	$0,48 \pm 0,00$	$4,78 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,00$	$4,55 \pm 0,03$
		směs	$0,35 \pm 0,02$	$3,54 \pm 0,22$	$0,29 \pm 0,01$	$2,88 \pm 0,08$
	15/100	květ	$0,61 \pm 0,03$	$4,04 \pm 0,18$	$1,08 \pm 0,01$	$7,20 \pm 0,08$
		směs	$0,41 \pm 0,03$	$2,73 \pm 0,17$	$0,51 \pm 0,02$	$3,39 \pm 0,13$

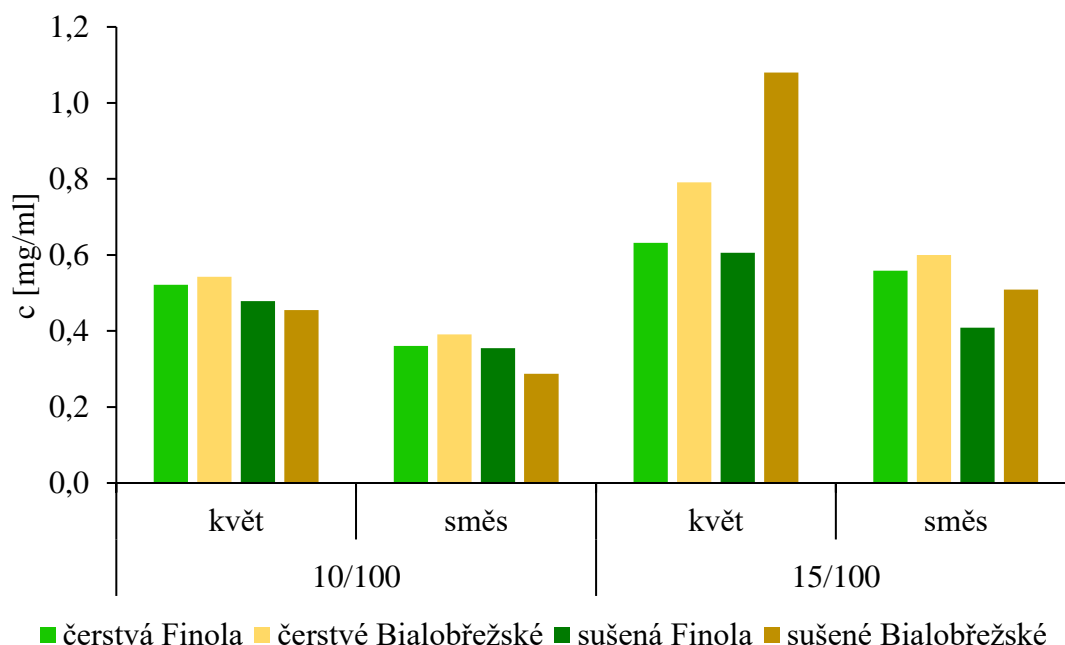
Obsah celkových flavonoidů je vyjádřen v ekvivalentech flavonoidu Katechínu, který byl použit jako standard při měření kalibrační závislosti. Množství flavonoidů je vyšší u extraktů čerstvého konopí, jak je patrné z uvedené tabulky (viz Tab. 14). To by mohlo být způsobeno stabilitou flavonoidů, které vlivem sušení degradují. Na degradaci má vliv teplota, doba sušení, ale i samotný způsob sušení, protože sušení mrazem je mnohem šetrnější, jelikož nedochází k takovému rozkladu flavonoidů [59].



Zároveň lze dosažené výsledky srovnat i s tabulkou obsahu celkových polyfenolů (viz Tab. 13), jelikož flavonoidy jsou podskupinou polyfenolů. Logicky by tedy množství flavonoidů mělo být menší než hodnoty polyfenolů (flavonoidy jsou jen jednou částí skupiny těchto látek). Po srovnání všech získaných hodnot uvedených ve zmíněných tabulkách je patrné, že je tato podmínka splněna.

Extrakty připravené z čerstvého a sušeného konopí byly opět srovnávány jednotlivě z hlediska typu extraktu (konopný květ nebo směs) a dané odrůdy. Srovnání podle koncentrace konopí (naváženého množství) bylo pouze kontrolní. Obsah celkových flavonoidů v analyzovaných extraktech čerstvé i sušené rostliny se pohybuje v rozmezí 0,29–1,08 mg/ml extraktu (resp. 2,88–7,20 mg/g rostliny). U níže uvedeného grafu Obr. 15 lze pozorovat podobný trend jako u obsahu celkových polyfenolů. Množství celkových flavonoidů v extraktech z čerstvého konopí je opět vyšší v extraktech květu. Rovněž je viditelné, že odrůda Bialobřežské obsahuje více flavonoidů než Finola.

Přítomnost flavonoidů v extraktech sušeného konopí vykazuje některé překvapující výsledky. Doposud byly všechny měřené obsahy pozorovaných látek vyšší u odrůdy konopí Bialobřežské. Jak je vidět v grafu (viz Obr. 15), hodnoty méně koncentrovaných extraktů sušeného konopí Bialobřežského jsou nižší než u Finoly. Tento rozdíl však není příliš veliký (rozdíl se pohybuje v setinách mg) a mohl být ovlivněn například měřením nebo samotným vzorkem použitého konopí. Žádná rostlina jistě není úplně totožná, co se přítomných látek týče, a to platí i pro případy, kdy se jedná o stejnou rostlinu. I v rámci jedné odrůdy se mohou vyskytnout takové nepatrné rozdíly v množství obsahových látek, které mohou být způsobené různými faktory, například v důsledku zpracování rostliny. Při srovnání květu a směsi je však opět viditelně vyšší obsah celkových flavonoidů ve vzorcích extraktů připravených z konopných květů.

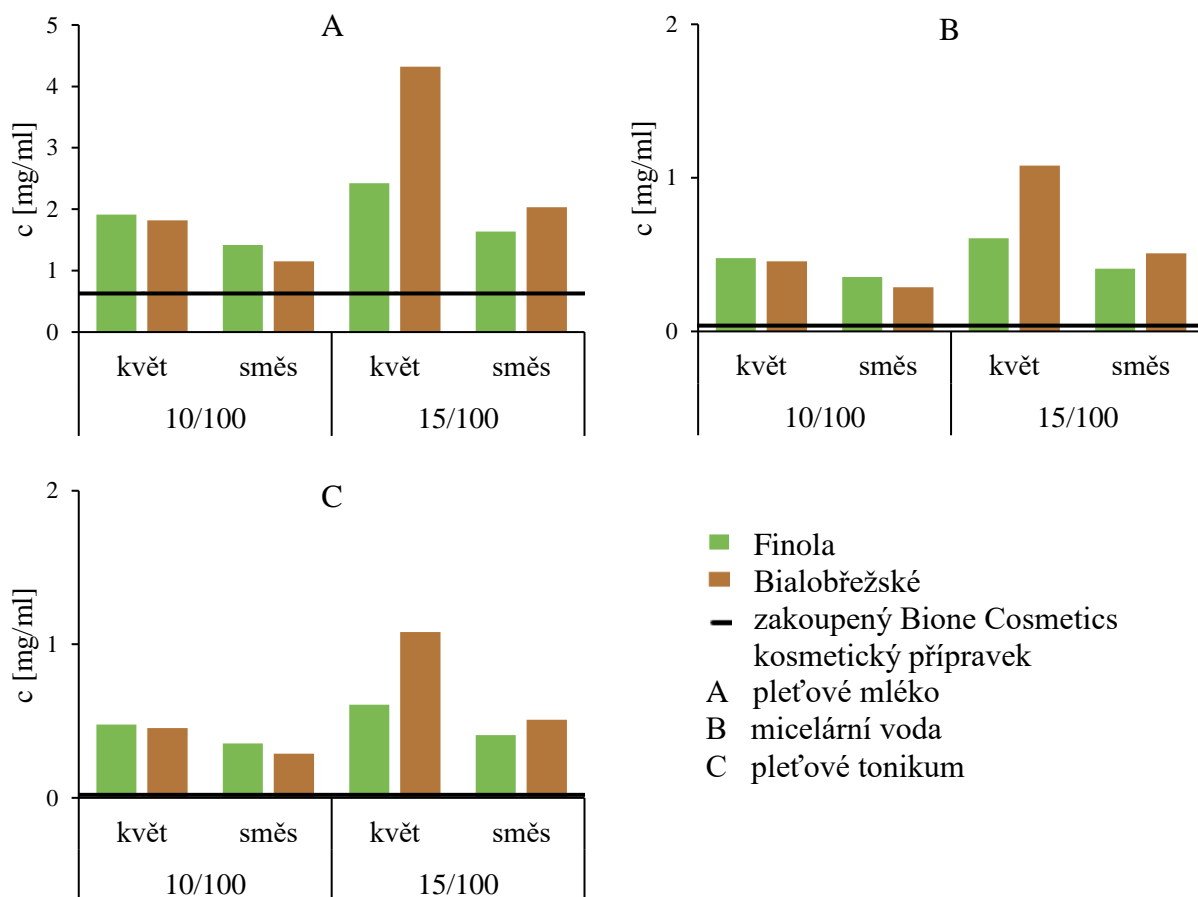


Obr. 15: Obsah flavonoidů v konopných extraktech

### 5.3.2 Kosmetické přípravky

Opět byl pro srovnání vytvořen graf obsahu celkových flavonoidů v připravených kosmetických přípravcích. Tyto hodnoty byly pouze přepočteny z již získaných dat, protože bylo známo množství přidávaných extraktů ze sušeného konopí. Vodorovná čára v následujícím obrázku (viz Obr. 16) představuje opět množství flavonoidů v zakoupených přípravcích, které už byly získány měřením.

Množství flavonoidů je vyjádřeno v mg na ml přípravku. Opět jsou tato množství velmi nízká s tím, že pouze pleťové mléko dosahuje o něco vyšších hodnot.



Obr. 16: Přehled obsahu flavonoidů v kosmetických přípravcích

## 5.4 Antioxidační aktivita

Celková antioxidační aktivita všech analyzovaných vzorků byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.7. Výsledné absorbance byly vypočteny jako aritmetický průměr získaných hodnot podle rovnice (1), s tím, že pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát. Antioxidační aktivita ve vzorku byla získána po dosazení průměrné absorbance do rovnice přímky kalibrační křivky, která je uvedena v poslední kapitole (viz Příloha 3). Rovnice kalibrace antioxidační aktivity je  $y = 0,0011x$ .

### 5.4.1 Extrakty

Antioxidační aktivita je vyjádřena jako hodnota ekvivalentu standardu Troloxu. Hodnoty vzorků čerstvého konopí byly opět pro doplnění přepočítány na 1 g sušené rostliny (přepočteno dle výsledků gravimetrického měření popsaného v kapitole 4.4). Všechny získané hodnoty, včetně směrodatné odchylky vypočtené funkcí Excelu, jsou uvedeny v Tab. 15. Dvě rozdílné koncentrace vzorků specifikovaných v kapitole 4.4.1 jsou zde pro větší přehlednost vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

Tab. 15: Antioxidační aktivita vzorků extraktů

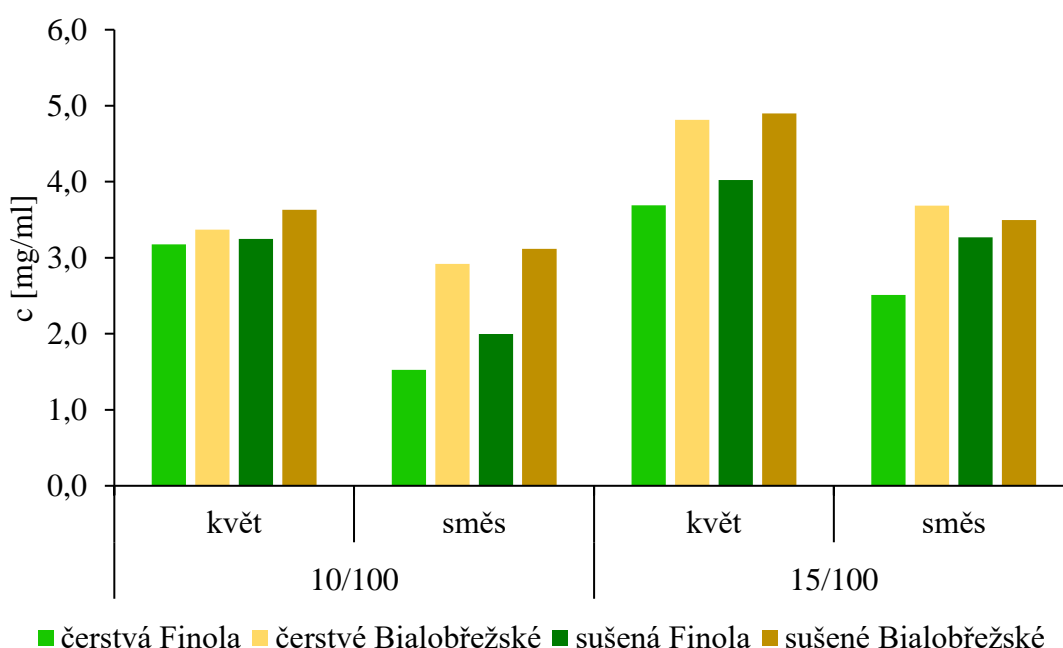
Odrůda			FINOLA		BIALOBŘEŽSKÉ	
úprava	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	koncentrace		koncentrace	
			[mg/ml]	[mg/g]	[mg/ml]	[mg/g]
čerstvá	10/100	květ	$3,17 \pm 0,25$	$31,74 \pm 2,47$	$3,37 \pm 0,11$	$33,70 \pm 1,15$
		směs	$1,52 \pm 0,22$	$15,24 \pm 2,17$	$2,92 \pm 0,16$	$29,21 \pm 1,62$
	15/100	květ	$3,69 \pm 0,07$	$24,61 \pm 0,49$	$4,82 \pm 0,14$	$32,10 \pm 0,94$
		směs	$2,51 \pm 0,16$	$16,74 \pm 1,07$	$3,69 \pm 0,31$	$24,57 \pm 2,04$
sušená	10/100	květ	$3,25 \pm 0,15$	$32,50 \pm 0,45$	$3,63 \pm 0,07$	$36,32 \pm 0,71$
		směs	$2,00 \pm 0,05$	$19,97 \pm 0,53$	$3,12 \pm 0,03$	$31,18 \pm 0,26$
	15/100	květ	$4,02 \pm 0,12$	$26,82 \pm 0,81$	$4,90 \pm 0,12$	$32,67 \pm 0,77$
		směs	$3,27 \pm 0,02$	$21,79 \pm 0,13$	$3,50 \pm 0,08$	$23,30 \pm 0,56$

Zvolená metoda pro stanovení antioxidační aktivity se nazývá TEAC neboli Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Výsledné hodnoty jsou tedy uvedeny v ekvivalentech Troloxu. Jak je vidět v tabulce (viz Tab. 15), vyšší antioxidační aktivitu vykazovaly extrakty připravené ze sušeného konopí. Jak již bylo zmíněno, je to způsobeno vznikem dalších biologicky aktivních látek při dekarboxylaci. Proto stejně jako vyhodnocení předešlých stanovení jsou i antioxidační aktivity srovnány zvlášť pro extrakty čerstvého konopí a zvlášť pro extrakty konopí sušeného. Pozorovány byly rozdíly i mezi hodnotami obou typů extraktů a odrůd konopí. Jako kontrola sloužilo opět srovnání podle koncentrace konopí (naváženého množství).

Ze všech analyzovaných extraktů konopí měl nejvyšší antioxidační aktivitu extrakt sušeného květu, konkrétně  $4,90 \pm 0,12$  mg/ml extraktu (resp.  $32,67 \pm 0,77$  mg/g rostliny). Všechny ostatní hodnoty TEAC extraktů jsou uvedeny v Tab. 15.

U extraktů čerstvého konopí v rámci antioxidační aktivity bylo dosaženo očekávaných výsledků, a to z hlediska všech sledovaných parametrů. Vyšší hodnoty byly naměřeny jednak u extraktů květu, ale také jak je patrné z následujícího grafu (viz Obr. 17), vyšší antioxidační aktivitu má odrůda konopí Bialobřežské.

Opět můžeme vidět, že i u extraktů sušeného konopí je vyšší antioxidační aktivita v případě extraktů květu. Dále se také potvrdilo to, že větší celkový antioxidační účinek má konopí Bialobřežské než odrůda Finola (pouze s jednou výjimkou sušené směsi vyšší koncentrace, ovšem tento rozdíl není nijak významný).



Obr. 17: Antioxidační aktivita konopných extraktů

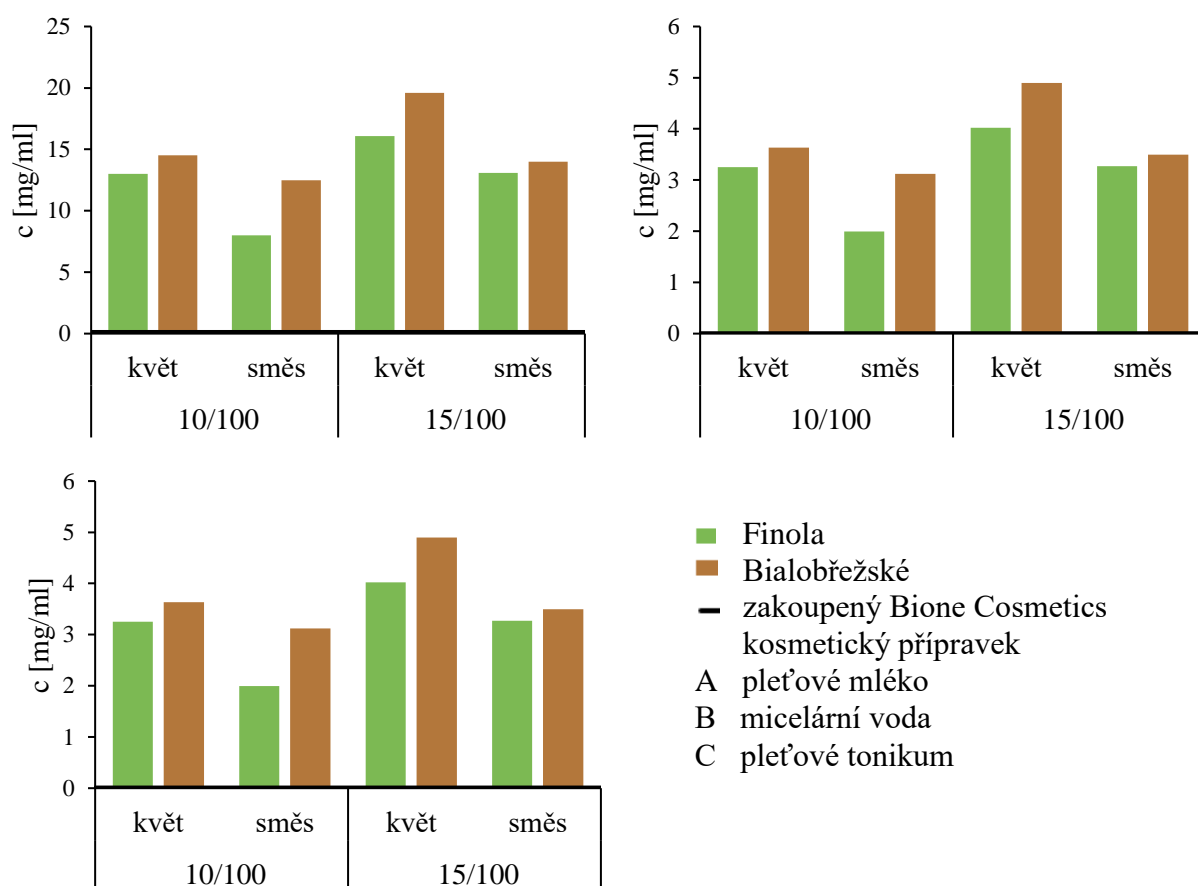
#### 5.4.2 Kosmetické přípravky

Antioxidační aktivita připravených kosmetických přípravků byla opět vypočtena díky známému množství přidaných extraktů ze sušeného konopí. U zakoupených kosmetických přípravcích byla hodnota TEAC zjištěna standardně měřením.

Výsledné hodnoty ekvivalentu Troloxu v mg na ml přípravku je znázorněno na Obr. 18. Antioxidační aktivita zakoupených kosmetických přípravků je opět vyznačena vodorovnou čarou, ovšem tato hodnota byla velmi nízká, takže se blíží prakticky až k nule.

U připravených kosmetických přípravků je podobný trend jako u vzorků extraktů. Jak lze z principu vyvodit, hodnoty TEAC jsou vyšší než koncentrace polyfenolů (a tím i flavonoidů).

Ovšem zakoupené kosmetické přípravky mají tyto hodnoty nižší než koncentrace analyzovaných antioxidantů. To by mohlo být způsobeno pravděpodobně chybou měření anebo byly zakoupené přípravky před porizením špatně skladovány. Balení těchto výrobků představuje totiž pouze klasická průhledná láhev. Některé látky s antioxidačním účinkem tak mohou vlivem působení světla ztrácet tuto schopnost [60].



Obr. 18: Přehled antioxidační aktivity kosmetických přípravků

## 5.5 Obsah kanabinoidů

Pro stanovení obsahu kanabinoidů v konopí byla zavedena pro laboratoř Ústavu chemie potravin a biotechnologií HPLC metoda. Jelikož se jedná o nově zavedenou metodu optimalizovanou pro podmínky a vybavení této laboratoře, je potřeba ještě v rámci dalších prací tuto metodu zdokonalit pro úplné rozdělení všech píků, aby je bylo možné kvantifikovat zvlášť.

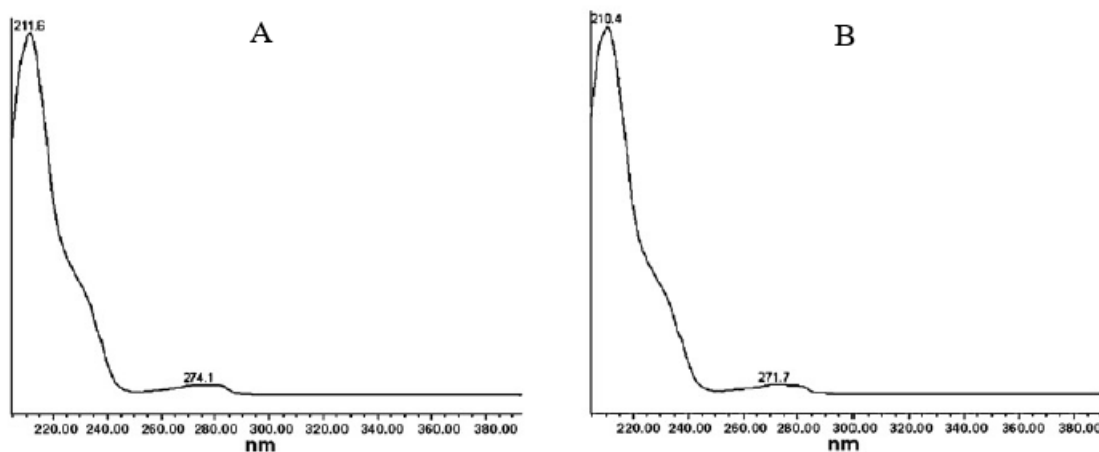
Ve vzorcích extraktů ze sušeného konopí byl dle postupu uvedeného v kapitole 4.8 stanoven obsah vybraných kanabinoidů (CBD, CBG, CBN, CBC). Výsledná intenzita odezvy byla vypočtena jako aritmetický průměr hodnot z opakovaného měření. Pro kalibrační křivku byl připraven směsný roztok kanabinoidů CBG, CBD, CBN a CBC. Obsah jednotlivých kanabinoidů ve vzorku byl pak získán po dosažení průměrné intenzity odezvy do rovnice přímky dané kalibrační křivky. Kalibrace kanabinoidů jsou uvedeny v poslední kapitole (viz Příloha 4, Příloha 5 a Příloha 6). Rovnice kalibrace směsného píků CBG a CBD je  $y = 770\,937x$ , pro kanabinoid CBN je to rovnice  $y = 674\,102x$  a pro CBC  $y = 404\,310x$ .

Vzorek extraktu z čerstvého konopí byl analyzován pouze jeden pro kontrolu, jelikož vybrané neutrální kanabinoidy jsou přítomny až v sušené rostlině po dekarboxylaci jejich kyselé formy.

### 5.5.1 Vývoj metody

Nejdříve byla pro stanovení jednotlivých kanabinoidů ve směsném vzorku pro kalibrační křivku využita gradientová eluce s mobilní fází o složení A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a B: 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (dle uvedeného článku). Použita byla kolona Kinetex 5  $\mu$  C18, 4,6 x 150 mm. Výsledkem však bylo nedostatečné rozdělení všech píků (CBG a CBD splývají v jeden pík) a poměrně dlouhá doba separace [61].

Kanabidiol (CBD) a kanabigerol (CBG) jsou strukturně velmi podobné látky se stejnými funkčními skupinami ve shodném počtu, které by se teoreticky zapojily do interakcí s mobilní a se stacionární fází. Pro kontrolu byl tedy vždy naměřen i chromatogram zvlášť pro CBD a zvlášť pro CBG. Bylo zjištěno, že jejich retenční časy se liší pouze v setinách, navíc jsou prakticky totožná i spektra, což bylo pro kontrolu ověřeno i srovnáním s odborným článkem. Jak je vidět na následujícím obrázku, průběh i vlnové délky maxima jsou u CBD (Obr. 19A) téměř stejná jako u CBG (Obr. 19B) [62].

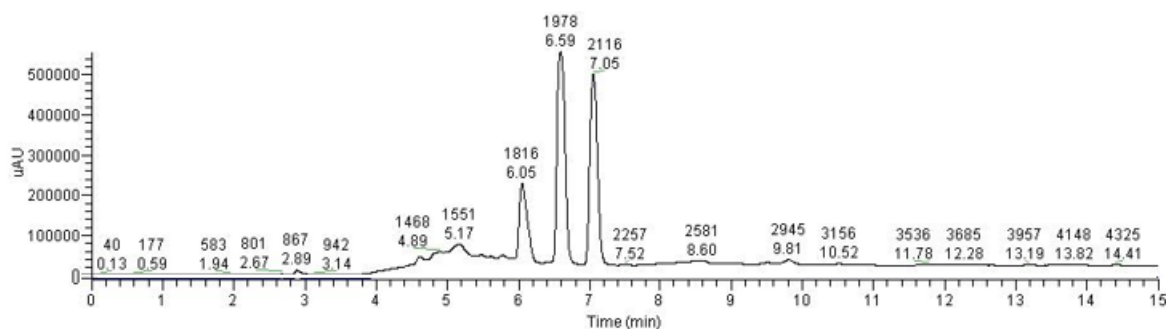


Obr. 19: Spektrum CBD a CBG dle článku [62]

Pro další stanovení s použitím směsného vzorku kanabinoidů byly použity obdobné podmínky separace i mobilní fáze, u které byl zaměněn pouze acetonitril za metanol. Ovšem ani v tomto případě nebylo dělení dostatečné [63].

Dále byla pro separaci využita izokratická eluce s mobilní fází nejdříve čistý metanol a poté čistý acetonitril. Pro čistý metanol s izokratickými podmínkami byla vyzkoušena i kolona Hypercarb 3  $\mu$ , 2,1 x 100 mm. Ve všech případech však nebyly spojené píky rozděleny a za použití acetonitrilu byla doba analýzy prodloužena.

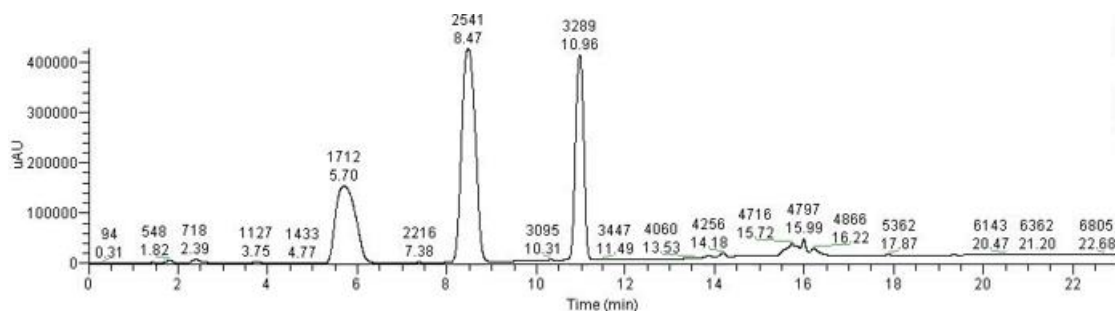
Dle článku byl použit 50mM octan amonný ve vodě pro mobilní fázi A a pro B čistý metanol. Opět byla využita kolona Kinetex 5  $\mu$  C18, 4,6 x 150 mm a gradientová eluce (průběžně vhodně měněná pro dosažení lepších výsledků). Konečný chromatogram obsahoval opět spojený pík (viz Obr. 20), ovšem tvar píků a doba separace dosahovala lepších výsledků [64].



Obr. 20: Chromatogram směsného vzorku (grad:  $H_2O + CH_3COONH_4 + MeOH$ , C18 5  $\mu$ )

Dále byla připravena obdobná mobilní fáze obsahující čistou vodu s metanolem v gradientové eluci. Pro separaci kanabinoidů však byla pro možnost lepšího dělení využita kolona s menším zrněním Kinetex 2,6  $\mu$  C18, 4,6 x 150 mm. Doba analýzy byla přizpůsobena koloně, tedy zdvojnásobena, ovšem i přesto nebyla schopna píky CBG a CBD rozdělit.

Jelikož nebyla k dispozici jiná vhodná kolona pro tuto separaci, ale také kvůli časovým možnostem, byla vybrána nejlepší kolona, mobilní fáze a separační podmínky pro stanovení kanabinoidů. Kolona byla zvolena Kinetex 5  $\mu$  C18, 4,6 x 150 mm, gradientová eluce a mobilní fáze o složení A: čistá voda (popř. s přidavkem 50mM octan amonného), B: čistý metanol. Srovnáním obrázku Obr. 20 a následujícího chromatogramu (Obr. 21), kde v mobilní fázi již nebyl octan amonný, si lze všimnout, že v obou případech není rozdělený pík, ovšem tvar, odezva a doba analýzy jsou vyhovující. Jako mobilní fáze byla tedy zvolena čistá voda a metanol, jelikož v tomto případě nejsou píky těsně za sebou, takže lze předpokládat, že u vzorků extraktu bude jejich snadnější identifikace. Dále byla pouze zkrácena doba analýzy.

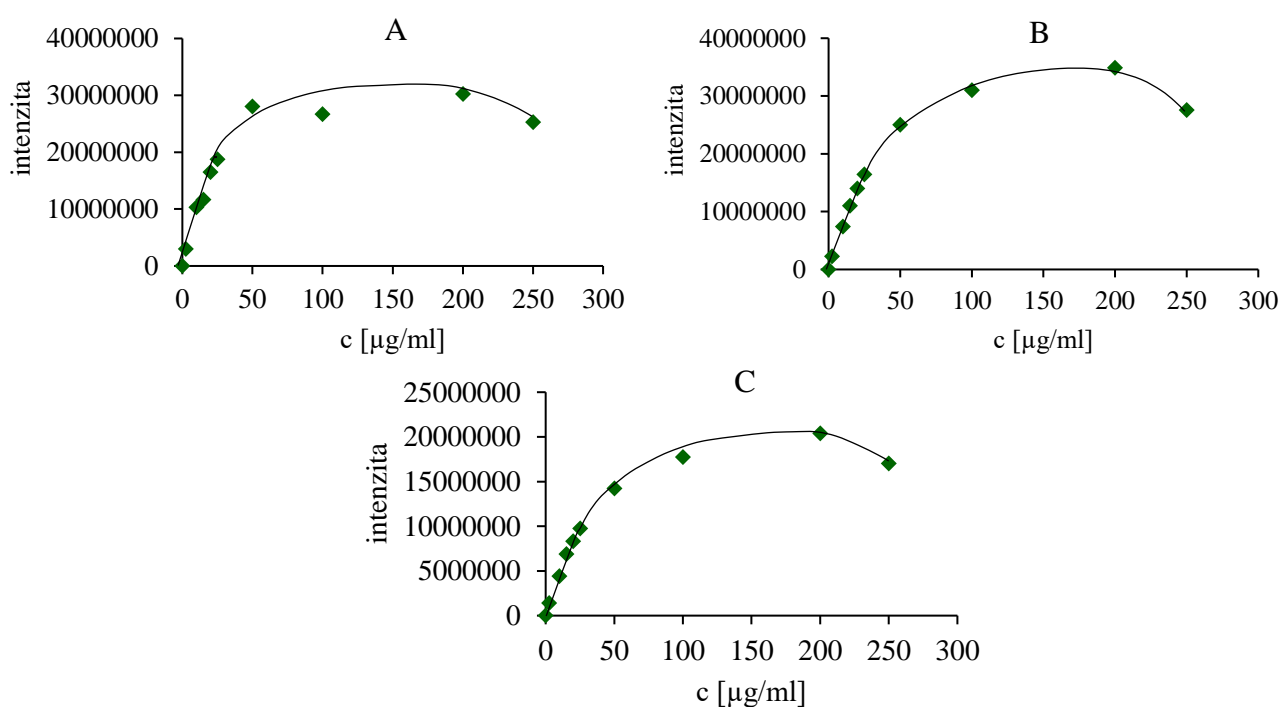


Obr. 21: Chromatogram směsného vzorku (grad:  $H_2O + MeOH$ , C18 5  $\mu$ )

### 5.5.2 Stanovení pracovního rozsahu a linearity kalibrace

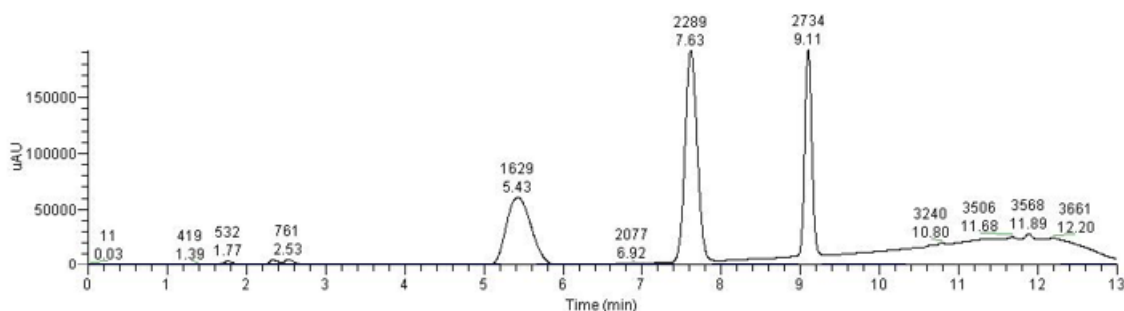
Před měřením kalibrační závislosti byl nejdříve stanoven pracovní rozsah, maximální koncentrace směsného vzorku CBD, CBG, CBN a CBC, do které je tato přímka lineární. Jednotlivé standardy o koncentraci 1 mg/ml byly zředěny na výslednou koncentraci směsného vzorku kanabinoidů 250  $\mu\text{l/ml}$ . Tento roztok byl dále vhodně ředěn až na koncentraci 100  $\mu\text{l/ml}$ . Po naměření příslušných chromatogramů, integraci píků a vytvoření grafů nebyla zjištěna rostoucí lineární závislost. Následně se tedy pokračovalo dalším ředěním až po koncentraci 2,5  $\mu\text{l/ml}$ . Všechny získané hodnoty pak byly vyneseny do grafu a spojeny v křivku.

Byly tak sestaveny grafy závislosti analytické odezvy na koncentraci daných kanabinoidů, které jsou uvedeny na následujícím obrázku. Pro směsný pík CBG+CBD je to graf Obr. 22A, pro kanabinoid CBN odpovídá graf Obr. 22B a pro CBC Obr. 22C.



Obr. 22: Závislost intenzity odezvy na koncentraci kanabinoidů

Na základě těchto grafů pak byla stanovena lineární oblast křivky, kdy jako maximální koncentrace pro kalibraci byla určena koncentrace 25  $\mu\text{l/ml}$ . Jednotlivé kalibrační křivky, jsou uvedeny v posledních kapitole. Na následujícím obrázku Obr. 23 je pak ukázka chromatogramu směsného vzorku kanabinoidů.



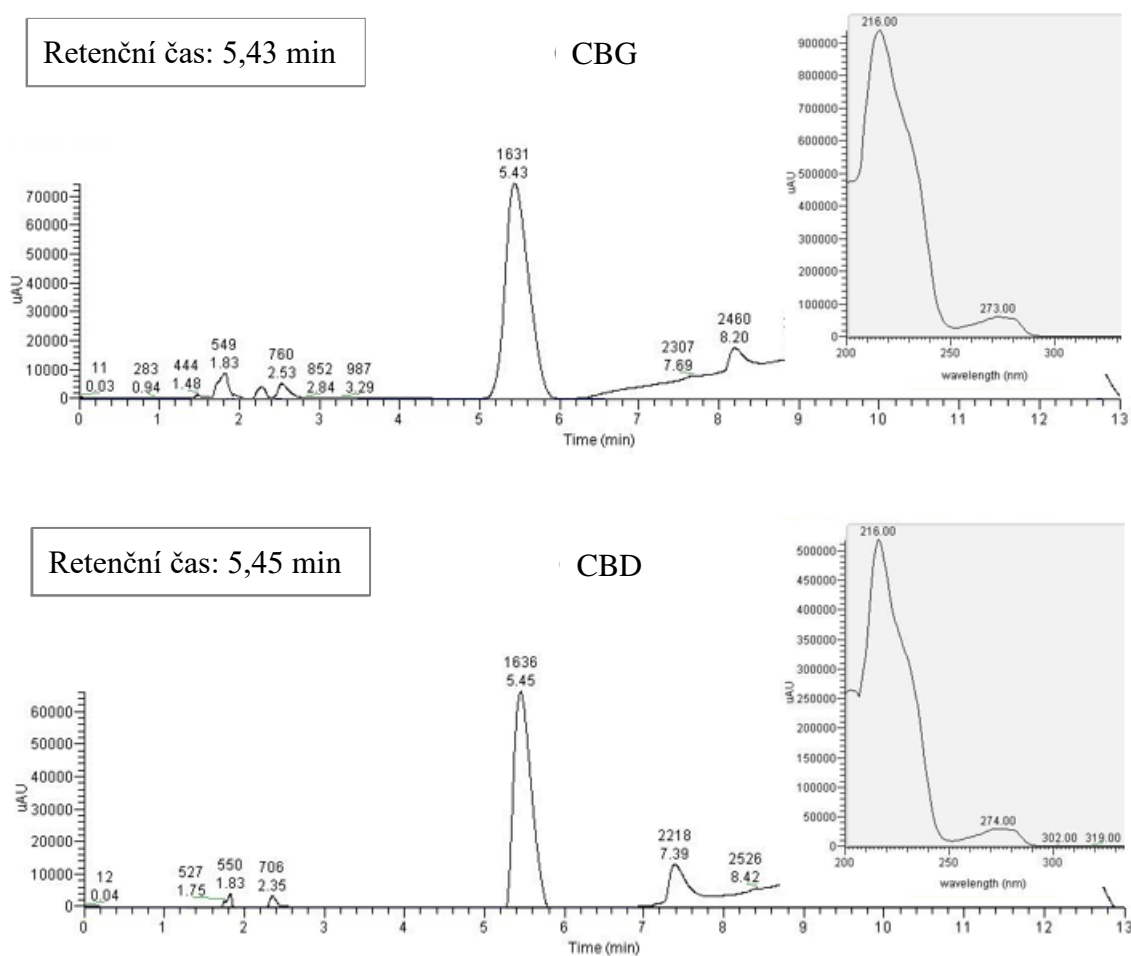
Obr. 23: Chromatogram směsného vzorku kanabinoidů



### 5.5.3 Kvalitativní charakteristiky kanabinoidů

Aby bylo možné správně přiřadit daný pík kanabinoidu ve vzorku extraktu ze sušeného konopí, byly tak pro ověření retenčních časů píků daných kanabinoidů a jednoznačnou identifikaci dle spektra naměřeny chromatogramy jednotlivých kanabinoidů ještě zvlášť dle postupu uvedeného v kapitole 4.8.

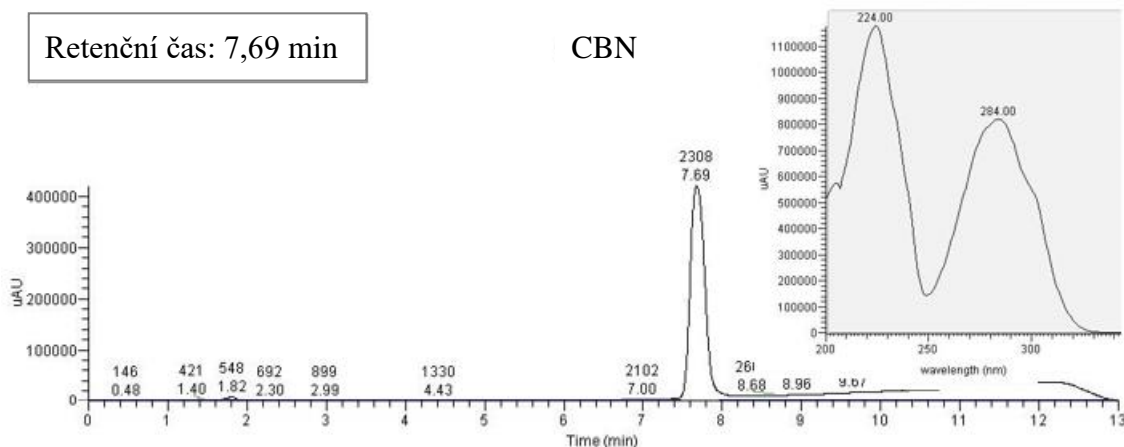
Nejdříve byly ověřeny jednotlivé chromatogramy kanabinoidů CBG a CBD, srovnány byly také jejich spektra s maximy a retenční časy. Naměřené chromatogramy včetně daných kvalitativních charakteristik (retenčních časů a spekter) obou kanabinoidů jsou uvedeny na následujícím obrázku Obr. 24.



Obr. 24: Kvalitativní charakteristiky CBG a CBD

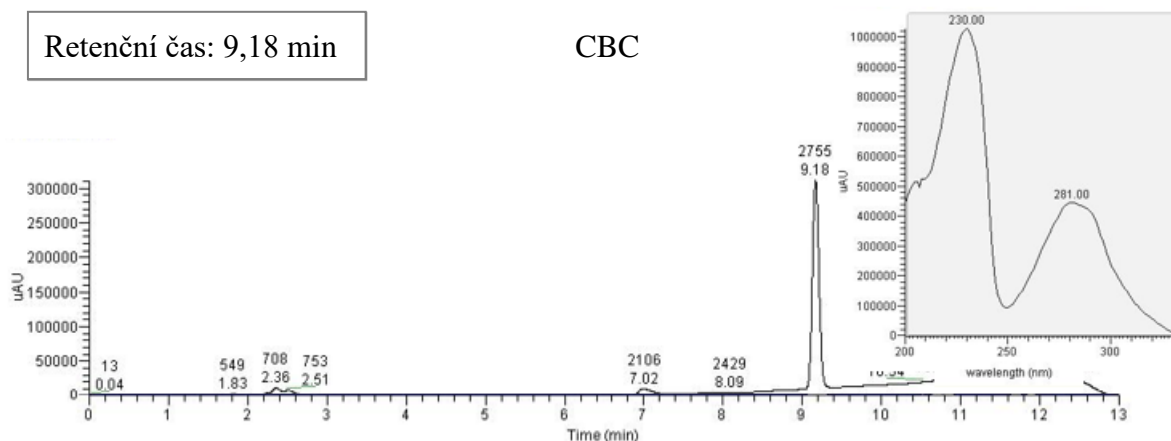
Bylo tak potvrzeno, že kanabigerol a kanabidiol mají velmi blízké retenční časy a prakticky stejná spektra, tudíž ve smíšeném vzorku kanabinoidů a tím i v samotných vzorcích extraktů sušeného konopí bude možno stanovit pouze smíšený pík CBG+CBD. Pro jejich dokonalé rozdělení je potřeba ještě na této metodě pracovat dále, což je téma, které by mohlo být předmětem dalších prací.

Dále byl naměřen zvlášť i chromatogram pro kanabinoid CBN, který je na zobrazen na následujícím obrázku Obr. 25.



Obr. 25: Kvalitativní charakteristiky CBN

Kvalitativní charakteristiky jako je retenční čas a spektrum bylo získáno zvlášť i pro kanabinoid kanabichromen (CBC). Tyto informace jsou shrnuty na obrázku níže (viz Obr. 26). Po srovnání s CBN je patrné, že oba kanabinoidy mají podobné spektrum, ovšem jednoznačně se liší v retenčním čase.



Obr. 26: Kvalitativní charakteristiky CBC

Jelikož vlivem dalších přítomných látek v konopí mohlo lehce dojít k posunu píků (ke změně retenčních časů), byla před samotným měřením vzorků provedena kontrola. Pro jednoznačnou identifikaci kanabinoidů ve vzorku byla ještě využita metoda standardního přídávku u vzorku extraktu sušeného květu konopí obou odrůd vyšší koncentrace. Tím byly získány retenční časy kanabinoidů v přítomnosti dalších látek konopí. U těchto píků byla samozřejmě zkontrolována i shodnost spekter.

### 5.5.4 Stanovené množství v extraktech

Obsah kanabinoidů ve vzorcích extraktů ze sušeného konopí byl stanoven dle uvedeného postupu (viz 4.8). Všechny získané hodnoty, včetně směrodatné odchylky vypočtené funkcí Excelu, jsou uvedeny v Tab. 16. Dvě rozdílné koncentrace konopí (navážené množství rostliny) specifikovaných v kapitole 4.4.1 jsou zde vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

Tab. 16: Obsah kanabinoidů v extraktech ze sušeného konopí

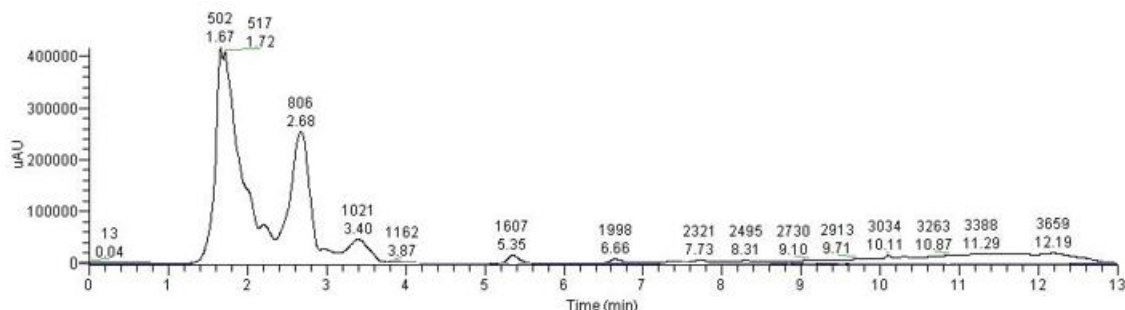
Kanabinoid			CBG+CBD		CBC	
odrůda	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	koncentrace		koncentrace	
			[μg/ml]	[μg/g]	[μg/ml]	[μg/g]
Finola	10/100	květ	168 ± 1	1677 ± 10	17 ± 1	168 ± 8
		směs	108 ± 13	1079 ± 130	9 ± 1	94 ± 13
	15/100	květ	170 ± 0	1136 ± 0	21 ± 5	137 ± 34
		směs	156 ± 12	1040 ± 82	18 ± 3	123 ± 18
Bialobřežské	10/100	květ	170 ± 4	1703 ± 43	14 ± 1	143 ± 7
		směs	124 ± 14	1242 ± 140	7 ± 2	69 ± 18
	15/100	květ	196 ± 0	1309 ± 0	13 ± 5	87 ± 33
		směs	137 ± 5	915 ± 35	13 ± 0	85 ± 3

Konopí Bialobřežské je vyšlechtěná odrůda, která dle kapitoly 2.1.4 obsahuje vyšší množství kanabidiolu než má Finola. Jak vyplývá z uvedené tabulky (viz Tab. 16), extrakty ze sušeného konopí Bialobřežského obsahují přibližně 10x více kanabinoidů CBG+CBD než Finola. Ovšem co se týče kanabichromenu CBC, větší množství se naopak nachází v extraktech ze sušeného konopí odrůdy Finola.

Kanabinoid CBN nebyl identifikován ani v jednom vzorku konopí. To by mohlo být patrně způsobeno tím, že kanabinol vzniká až z THC (viz kapitola 2.2.1) a obě odrůdy (Finola i Bialobřežské) představují zástupce konopí setého, které obsahuje velmi nízké procento THC. Z tohoto důvodu nebyl CBN ve vzorcích přítomen (popř. jen v minimálním množství, které nebylo detekovatelné), jelikož byl už jeho prekurzor přítomen v nízké koncentraci.

Jednotlivé vzorky byly opět porovnávány z hlediska typu extraktu a v závislosti na odrůdě. Srovnání dle koncentrace (naváženého množství) sloužila hlavně jako kontrola. Analyzovány byly pouze extrakty sušeného konopí, jelikož analyzované neutrální kanabinoidy se tvoří až po usušení.

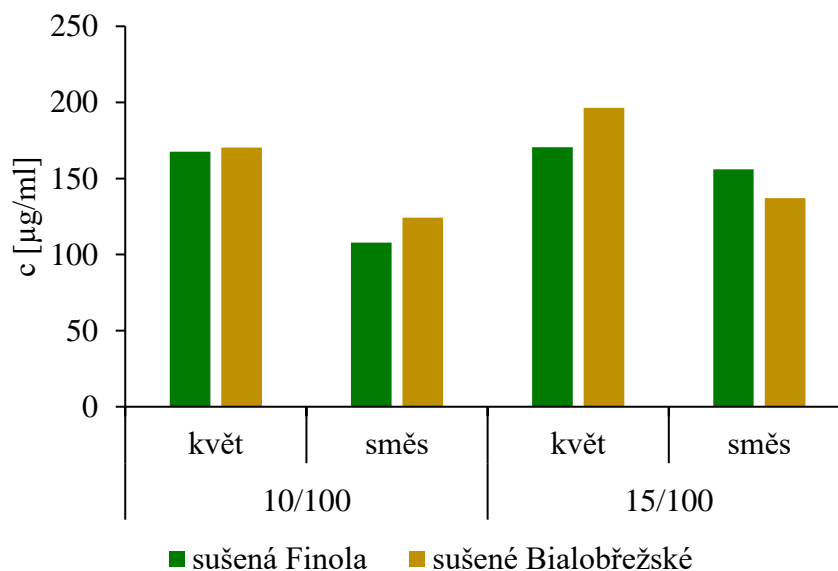
Pro kontrolu byl však změřen jeden vzorek extraktu čerstvého konopí. Po zkontrolování spekter všech píků chromatogramu (viz Obr. 27) nebyly vůbec identifikovány kanabinoidy CBN a CBC. Nacházel se zde pouze v malém množství směsný pík CBG+CBD. To by mohlo být způsobeno tím, že rostlina po sklizni už začala usychat, než byla další den zpracována. Nejdříve se tvoří právě CBG, ze kterého se následně tvoří ostatní kanabinoidy.



Obr. 27: Chromatogram vzorku extraktu čerstvého konopí Bialobřežského

V první řadě byly vzorky extraktů sušeného konopí srovnávány z hlediska obsahu CBG+CBD. Množství CBG+CBD ve vzorcích bylo celkově vyšší než obsah CBC. Všechny konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce Tab. 16.

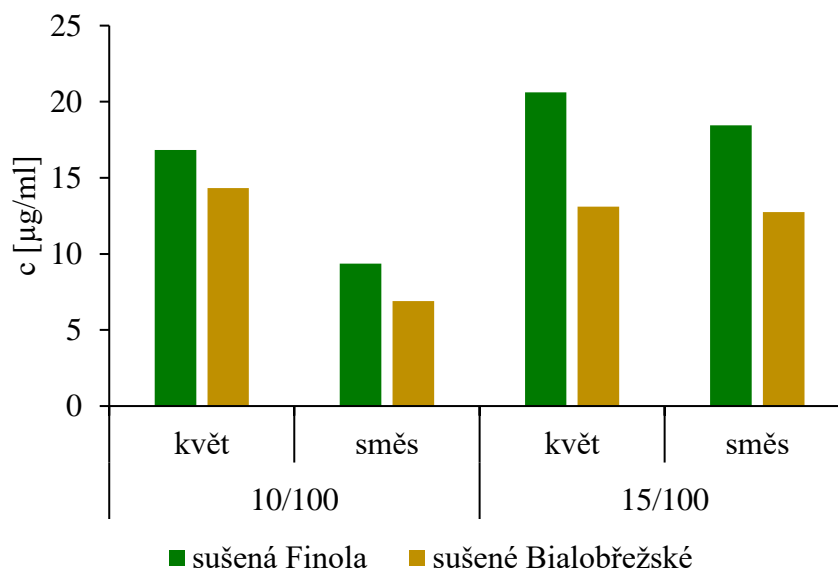
Jelikož se kanabinoidy tvoří v květech konopí a jejich přítomnost v ostatních částech rostliny je způsobena pouze přenosem, dle očekávání byl vyšší obsah ve vzorcích květů (viz Obr. 28). Srovnáním koncentrací CBG+CBD ve Finole a Bialobřežském bylo zjištěno, že je větší množství v druhé odrůdě, jak již bylo uvedeno.



Obr. 28: Obsah CBG+CBD v extraktech sušeného konopí

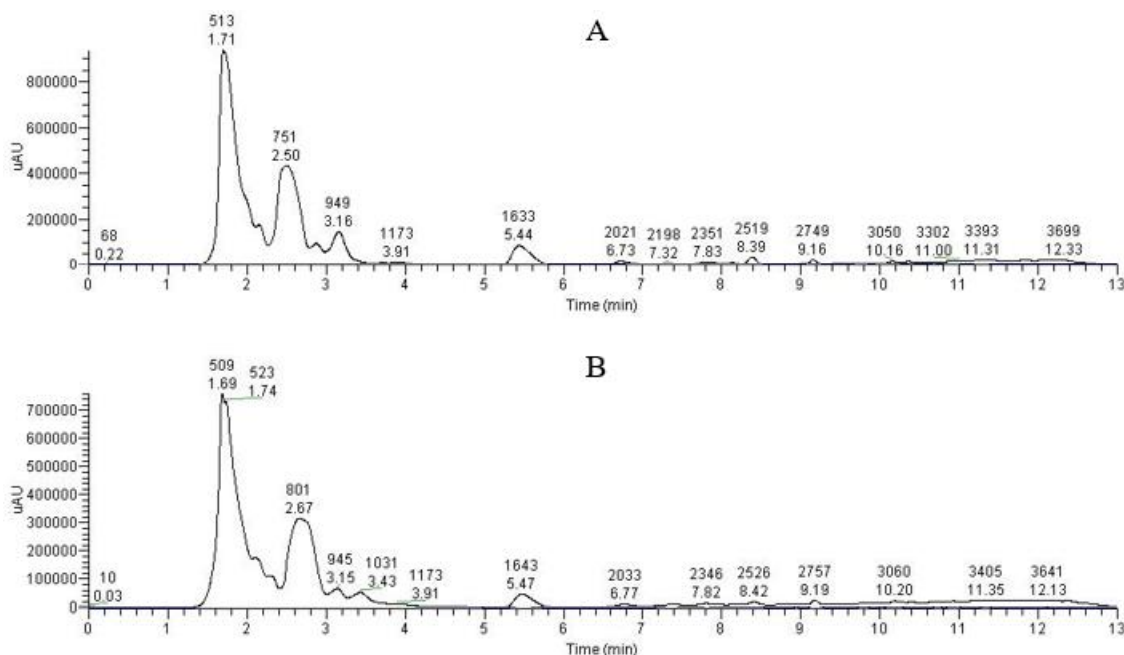
Poté byly vzorky srovnány z hlediska obsahu CBC. Tato množství byla nižší, jak lze vidět v uvedené tabulce Tab. 16, kde jsou také všechny konkrétní koncentrace kanabichromenu.

Dle typu extraktu, byl vyšší obsah CBC opět ve vzorcích extraktu květu, jelikož se tvoří primárně v této části rostliny. Ovšem srovnáním hodnot Finoly a Bialobřežského je zcela jasné, že větší množství obsahuje odrůda Finola, jak je zobrazeno na následujícím obrázku Obr. 29. Obě odrůdy konopí setého jsou speciálně vyšlechtěné a obsahují tak jiná množství jednotlivých kanabinoidů.



Obr. 29: Obsah CBC v extraktech sušeného konopí

Jak již bylo řečeno, kanabinoidy se tvoří v květu (palicích) konopí a na ostatní části rostliny se dostávají především přenosem. Na následujícím obrázku jsou uvedeny chromatogramy extraktu květu (Obr. 30A) a extraktu směsi (Obr. 30B). Jak je vidět, jsou prakticky totožné, není tedy rozdíl mezi kanabinoidy květu a směsi. Srovnány byly i výstupy obou odrůd konopí, přičemž ani v tomto případě nebyl zjištěn rozdíl v chromatogramu Finoly a Bialobřežského.



Obr. 30: Chromatogram vzorku extraktu sušeného konopí Bialobřežského

## 5.6 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita všech extraktů, připravených i zakoupených kosmetických přípravků byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.9. Stanoveno bylo celé spektrum mikroorganismů, tedy grampozitivní i gramnegativní bakterie a kvasinka. Difúzní agarový test byl využit pro stanovení antimikrobiální aktivity proti mikroorganismům *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*. Pro přesnější výsledky a zajištění anaerobních podmínek pro *Propionibacterium acnes* byla využita diluční jamková metoda.

### 5.6.1 Grampozitivní bakterie

Z použitých bakterií se mezi grampozitivní řadí *Micrococcus luteus* a *Propionibacterium acnes*. Analyzovány byly extrakty i kosmetické přípravky.

Diskovou agarovou metodou bylo zjištěno, že konopné extrakty z čerstvých i sušených odrůd konopí mají účinek proti grampozitivním bakteriím. Všechny získané hodnoty inhibičních zón jsou uvedeny v následující tabulce Tab. 17, přičemž byl započítán i blank (60% etanol). Dvě rozdílné koncentrace konopí (navážené množství rostliny) specifikovaných v kapitole 4.4.1 jsou zde vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

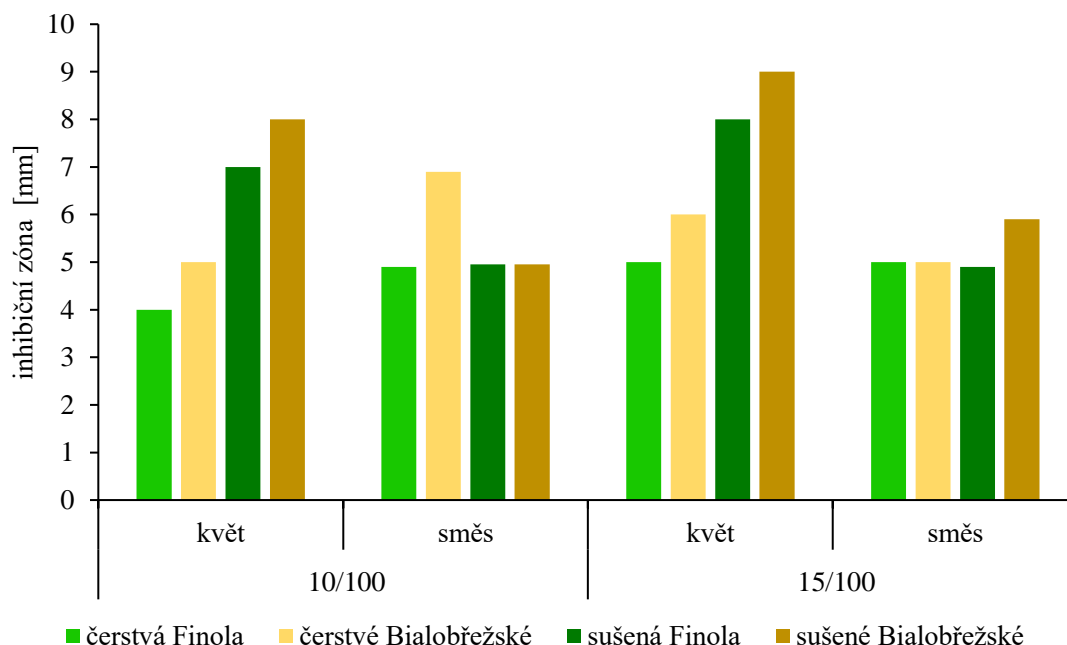
Tab. 17: Antimikrobiální aktivita extraktů proti *Micrococcus luteus*

Odrůda			Finola	Bialobřežské
úprava	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	poloměr inhibiční zóny [mm]	
čerstvá	10/100	květ	4,0	5,0
		směs	4,9	6,9
	15/100	květ	5,0	6,0
		směs	5,0	5,0
sušená	10/100	květ	7,0	8,0
		směs	5,0	5,0
	15/100	květ	8,0	9,0
		směs	4,9	5,9

Vzorky extraktů z čerstvého konopí vykazovaly v závislosti na typu velmi podobný antimikrobiální účinek. Z hlediska odrůdy pak bylo mírně účinnější konopí Bialobřežské.

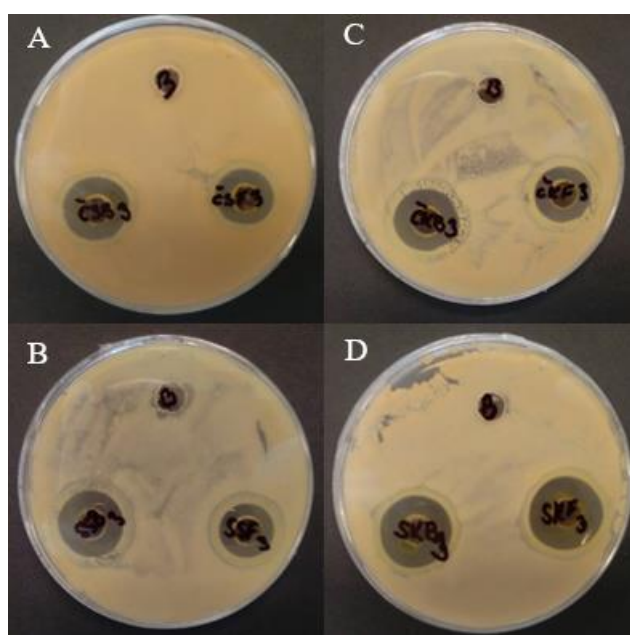
U vzorků extraktů sušené konopné směsi byl účinek obdobný jako u čerstvé rostliny. Antibakteriální aktivita však byla výrazně vyšší u vzorků ze sušeného konopného květu obou odrůd. Celkově tak ze všech extraktů konopí měl nejvyšší antibakteriální účinek proti *Micrococcus luteus* vzorek extraktu ze sušeného konopí odrůdy Bialobřežské o vyšší koncentraci (viz Obr. 31).

Výsledky antimikrobiálních účinků extraktů jsou tedy zajímavé tím, že hodnoty inhibičních zón u vzorků směsi (obou koncentrací i odrůd) se vesměs příliš neliší. Zato u vzorků extraktů květů jsou znatelné rozdíly v závislosti na odrůdě a samozřejmě i na koncentraci. Dle těchto výsledků lze vyvodit, že konopný květ obsahuje více antimikrobiálně účinných látek.



Obr. 31: Antimikrobiální aktivita konopných extraktů proti *Micrococcus luteus*

Na obrázku Obr. 32 jsou ukázky inhibičních zón vzorků vyšší koncentrace (levá jamka Finola, pravá jamka Bialobřežské). Na první pohled si lze povšimnout, že v případě D (sušený květ) je inhibiční zóna největší. Petriho miska A (směs) a C (květ) jsou pak ukázky čerstvých extraktů, kdy se inhibiční zóna liší jen o milimetry. V případě B (sušená směs) je vidět, že má Finola nepatrně menší účinek než Bialobřežské.

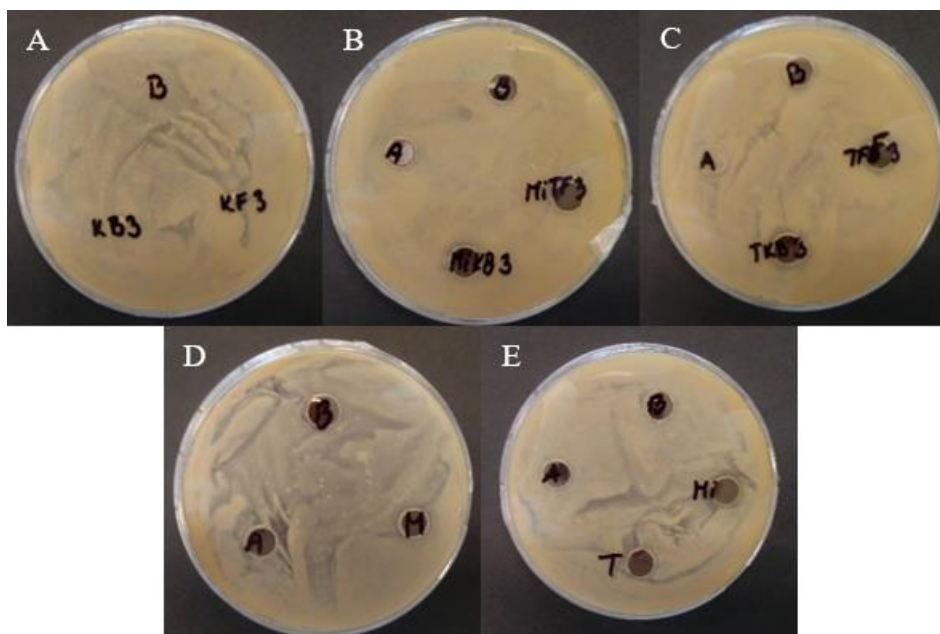


Obr. 32: Difúzní agarový test vzorku extraktů (*Micrococcus luteus*)



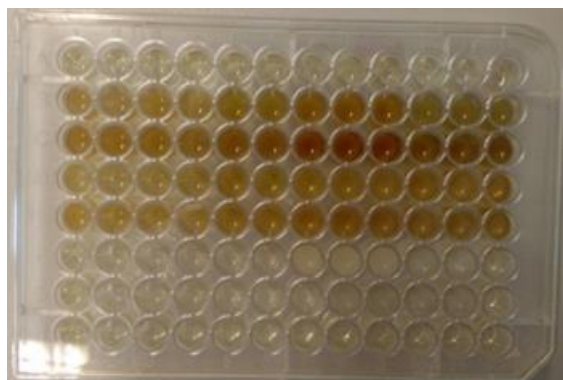
V případě vzorků připravených a koupených kosmetických přípravků nebyl zaznamenán prakticky žádný antimikrobiální účinek proti bakterii *Micrococcus luteus* (do 1 mm).

Na následujícím obrázku Obr. 33 je zaznamenáno, že nedošlo prakticky k žádné viditelné inhibici růstu. Na obrázku A–C jsou připravené kosmetické přípravky s přidavkem extraktu ze sušeného květu konopí Bialobřežského, kde A je pleťové mléko, B micelární voda a C pleťové tonikum. Kromě blanku (60% etanol) byl pro kontrolu testován i antimikrobiální účinek 0,1 % allantoinu, který byl přidán do micelární vody a tonika. Na obrázku Obr. 33D–E jsou pak zakoupené kosmetické přípravky, přičemž byl opět testován účinek allantoinu, který je přítomný ve všech třech produktech. Opět na těchto Petriho miskách není patrná žádná inhibiční zóna. Obrázek D je pleťové mléko a na obrázku E je pak tonikum (T) a micelární voda (Mi).



Obr. 33: Difúzní agarový test kosmetických přípravků (*Micrococcus luteus*)

Diluční jamkovou metodou byl zjištěn antimikrobiální účinek všech vzorků konopných extraktů čerstvého i sušeného konopí, ale také připravených a zakoupených kosmetických přípravků proti grampozitivní bakterii *Propionibacterium acnes*. Tato bakterie je anaerobní až mikroaerofilní, tento test na mikrotitrační destičce, který omezoval přísun kyslíku, tak splňoval tyto podmínky. Způsob provedení testu je zaznamenán na obrázku Obr. 34.



Obr. 34: Diluční jamková metoda s extrakty (*Propionibacterium acnes*)



Při této metodě byl podle postupu v kapitole 4.9.2 měřen zákal na začátku testu a po uplynutí 24 hodin. Při vyhodnocování pak byly získané absorbance od sebe odečteny, čímž byl zjištěn nárůst bakterie. Tyto hodnoty pak byly porovnány s nárůstem čisté kultury, přičemž byl vždy od jednotlivých vzorků odečten účinek příslušného základu (60% etanol v případě extraktů, kosmetický základ a allantoin u kosmetických přípravků).

Všechny získané hodnoty, které byly přepočteny na nárůst kultury (inhibiční účinek) v procentech, jsou uvedeny v následující tabulce Tab. 18. Tyto hodnoty byly získány jako aritmetický průměr naměřených hodnot s tím, že pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát. Dvě rozdílné koncentrace konopí (navážené množství rostliny) specifikovaných v kapitole 4.4.1 jsou zde opět vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

Tab. 18: Antimikrobiální účinek extraktů proti *Propionibacterium acnes*

Odrůda			Finola	Bialobřežské
úprava	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	nárůst kultury [%]	
čerstvá	10/100	květ	23,51	11,66
		směs	24,03	10,25
	15/100	květ	27,53	22,15
		směs	27,71	24,65
sušená	10/100	květ	20,67	32,39
		směs	21,78	22,78
	15/100	květ	23,33	5,31
		směs	42,01	36,48

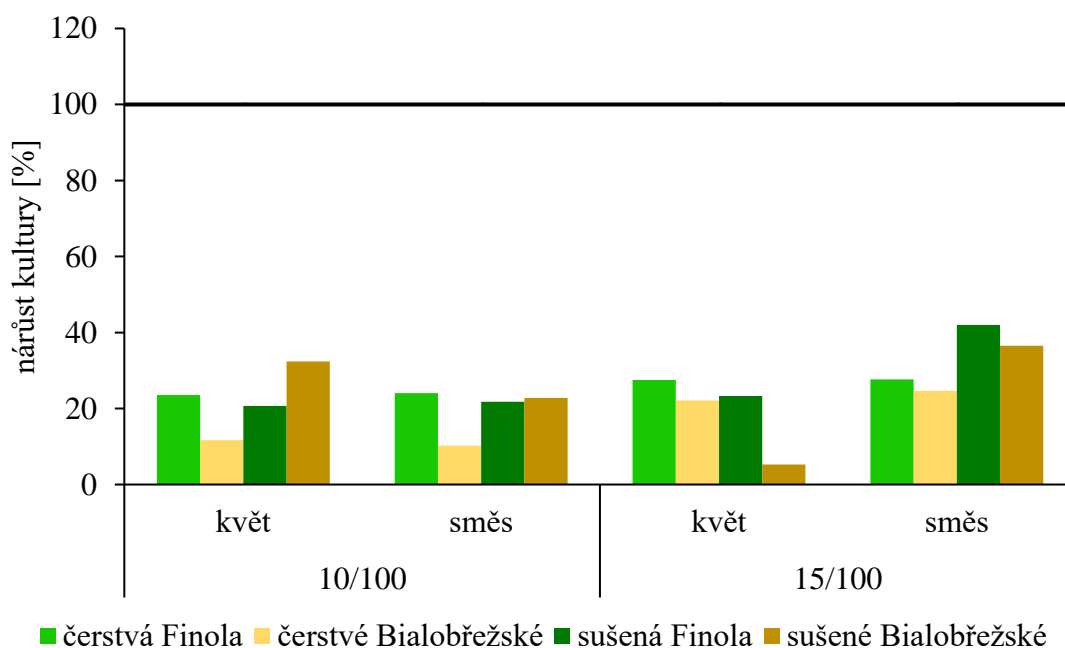
Graf Obr. 35, který zobrazuje nárůst kultury ve vzorcích, byl zpracován následujícím způsobem. Všechny vzorky byly porovnávány s nárůstem čisté kultury, která je v grafu vyznačena vodorovnou černou čarou. Od rozdílu absorbancí jednotlivých vzorků pak byl odečten inhibiční účinek 60% etanolu, tedy absorbance představující rozdíl mezi hodnotou čisté kultury a etanolu. Tím byla získána absorbance, která byla nižší než absorbance čisté kultury, což značí inhibici nárůstu této kultury. V případě, že by absorbance vzrostla, vzorek by obsahoval nějakou složku, která podporuje růst této bakterie. Výsledky pak byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kde 100 % značí čistou kulturu.

Z uvedeného způsobu vyhodnocování vyplývá, že čím nižší sloupeček (menší procento), tím nižší nárůst kultury, tedy lepší inhibiční účinek vzorku.

V následujícím grafu (viz Obr. 35) si lze všimnout, že nejnižší nárůst kultury byl v případě extraktu sušeného květu odrůdy Bialobřežské, kdy došlo pouze k 5,31% nárůstu ve srovnání s čistou kulturou (100 %). Až na tento případ není příliš významný rozdíl v inhibiční aktivitě mezi extrakty čerstvého a sušeného konopí.

Viditelný je však rozdíl mezi inhibičním účinkem jednotlivých odrůd, tedy rozdíl mezi antimikrobiální aktivitou vzorků extraktů čerstvé Finoly a čerstvého Bialobřežského. Nárůst kultury v případě Finoly překračoval 20 % ve srovnání s čistou kulturou, zato odrůda Bialobřežského vykazovala ve všech případech nižší hodnoty (lepší inhibiční účinek). U extraktů sušeného konopí ve vyšší koncentraci lze pozorovat obdobný průběh. Lepší antimikrobiální účinek proti *Propionibacterium acnes* má tedy na základě výsledků konopí Bialobřežské.

Srovnáním antimikrobiálního účinku extraktu konopného květu a konopné směsi bylo zjištěno, že ve většině případech byl nárůst kultury nižší u květu. Srovnávány byly vždy odpovídající si vzorky květ-směs stejné odrůdy a koncentrace. Z toho tedy plyne, že lepší inhibiční účinek má konopný květ.



Obr. 35: Antimikrobiální účinek extraktů (*Propionibacterium acnes*)

Diluční jamkovou metodou byl zjištěn i antimikrobiální účinek kosmetických přípravků proti *Propionibacterium acnes*. Všechny získané hodnoty přepočtené na nárůst kultury v procentech, jsou uvedeny v následující tabulce Tab. 19. Tyto hodnoty byly získány jako aritmetický průměr naměřených hodnot s tím, že pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát.

Do připravených kosmetických přípravků byly také přidávány extrakty sušeného konopí v množstvích 1 % v micelární vodě a pleťovém toniku, 4 % v pleťovém mléku. Proto byly opět dvě rozdílné koncentrace konopí (navážené množství rostliny) specifikovaných v kapitole 4.4.1 vyjádřeny v gramech navážené rostliny na ml použitého 60% etanolu.

Tab. 19: Antimikrobiální účinek kosmetických přípravků proti *Propionibacterium acnes*

Kosmetický přípravek			pleťové mléko	micelární voda	pleťová voda
odrůda	g rostliny/ml 60% EtOH	vzorek	nárůst kultury [%]		
Finola	10/100	květ	52,39	71,42	83,28
		směs	62,73	71,42	82,07
	15/100	květ	47,19	65,89	80,33
		směs	74,96	69,54	81,13
Bialobřežské	10/100	květ	51,81	73,41	82,03
		směs	70,70	72,47	79,88
	15/100	květ	48,04	60,25	81,58
		směs	52,84	61,58	85,52

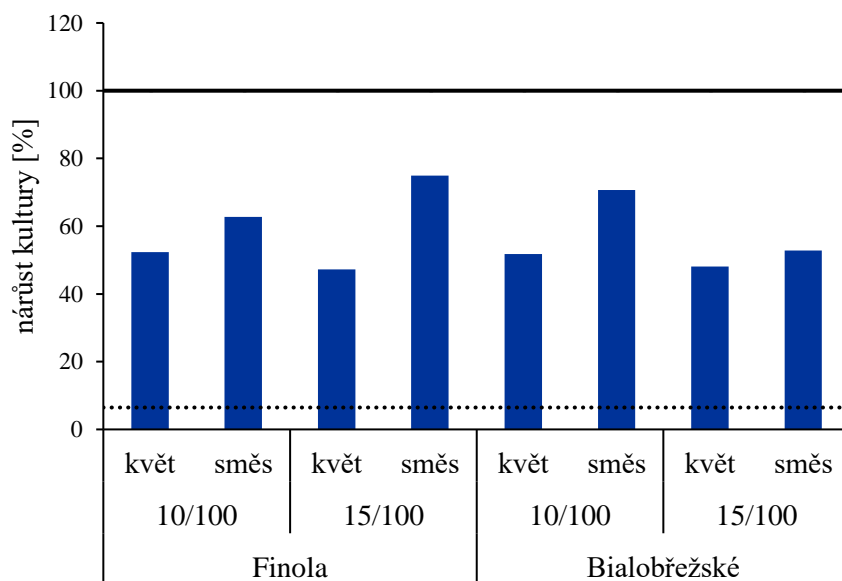
Následující grafy byly zpracovány obdobně jako vzorky extraktů. V případě kosmetických přípravků byl však od rozdílu absorbancí jednotlivých vzorků odečten inhibiční účinek daného kosmetického základu a inhibiční účinek 0,1% allantoinu (pokud byl použit v produktu). Další postup vyhodnocení byl již stejný, tedy výsledky byly přepočteny na nárůst kultury v procentech, kde 100 % značí čistou kulturu (vodorovná černá čára). To znamená, že v grafech opět tedy nižší sloupeček (menší procento) představuje nižší nárůst kultury (lepší inhibiční účinek vzorku).

V grafech kosmetických přípravků je však navíc zobrazen i inhibiční účinek odpovídajícího zakoupeného kosmetického přípravku, který je vždy vyznačen vodorovnou tečkovanou čarou. U těchto přípravků však nebyl odečten inhibiční účinek kosmetického základu, jelikož přesné složení s hmotnostmi není známo. Ve všech případech je antimikrobiální účinek zakoupeného kosmetického přípravku výrazně vyšší (tedy nárůst kultury je nižší), než u připravených přípravků. Jelikož komerční kosmetické produkty většinou neobsahují více než 1 % takovýchto extraktů, není tedy zcela jednoznačné, která složka přípravků vykazuje takto vysoký inhibiční účinek.

Ve všech případech připravených kosmetických přípravků byl nárůst kultury nižší než 100 %, tudíž všechny vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Jejich inhibiční účinek však není tak vysoký jako u samotných extraktů. Nejlepších výsledků dosáhlo pleťové mléko, které obsahovalo větší množství extraktu. Inhibiční účinek micelární vody a pleťového tonika byl srovnatelný, jelikož jejich složení se lišilo prakticky pouze v obsahu malého množství etanolu.

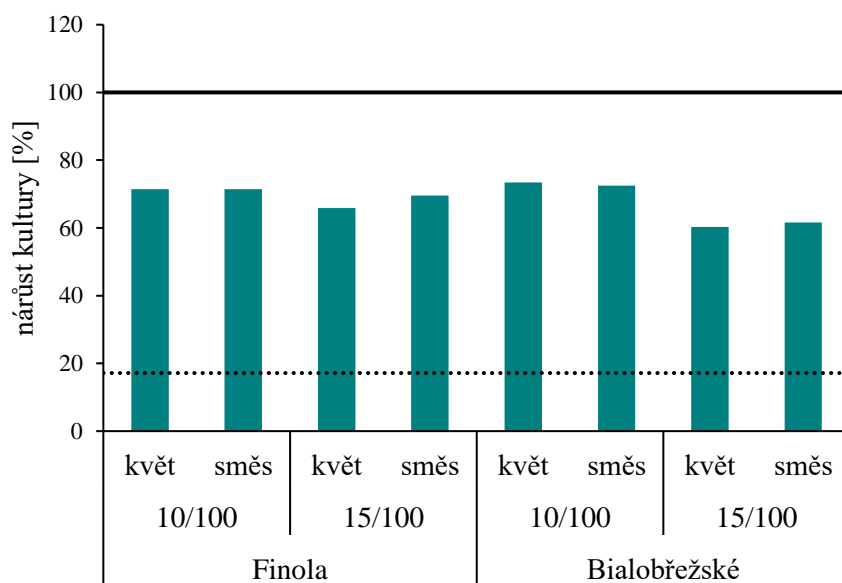
V první řadě je tu pleťové mléko s přidavkem 4 % extraktu sušeného konopí. Jak je vidět na obrázku Obr. 36, výraznější rozdíl je patrný především v závislosti na typu. Nižší nárůst kultury byl u kosmetických přípravků s přidavkem extraktu konopného květu. Prakticky žádný rozdíl nebyl v závislosti na koncentraci a odrůdě. V kosmetických přípravcích je obsaženo tak malé procento extraktu, že již nelze zaznamenat rozdíl v antimikrobiálním účinku mezi odrůdami.

Zakoupené pleťové mléko inhibovalo nárůst kultury až na 6,47 % (vodorovná tečkovaná čára). Takto veliký inhibiční účinek mohl být podpořen tím, že tento produkt obsahoval kromě konopného extraktu i konopný olej, který taktéž vykazuje antimikrobiální aktivitu.



Obr. 36: Antimikrobiální účinek pleťového mléka (*Propionibacterium acnes*)

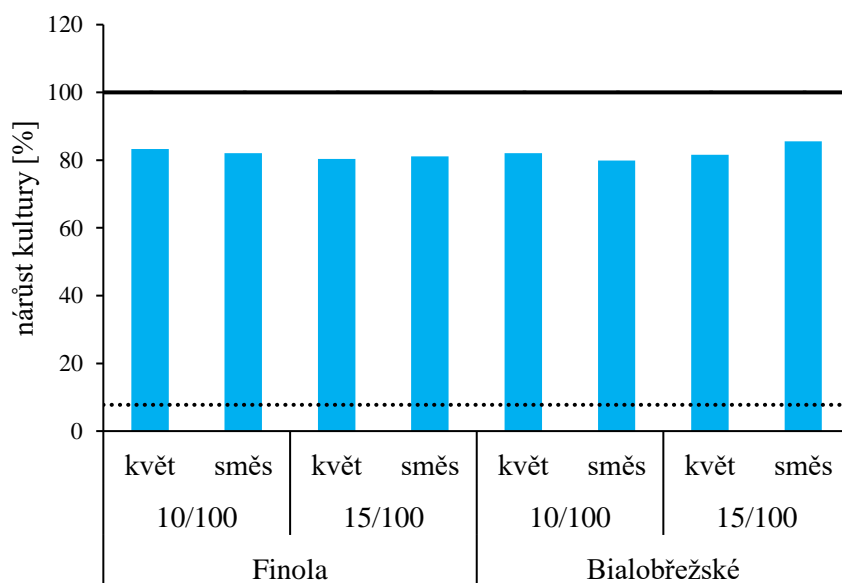
Nárůst kultury ve vzorcích micelární vody bylo již vyrovnané (viz Obr. 37), jelikož byl konopný extrakt přítomen již ve velmi malém množství, přičemž tento účinek už nebyl tolik závislý na odrůdě ani typu. Zakoupená micelární voda pak vykazovala 17,15% nárůst kultury.



Obr. 37: Antimikrobiální účinek micelární vody (*Propionibacterium acnes*)

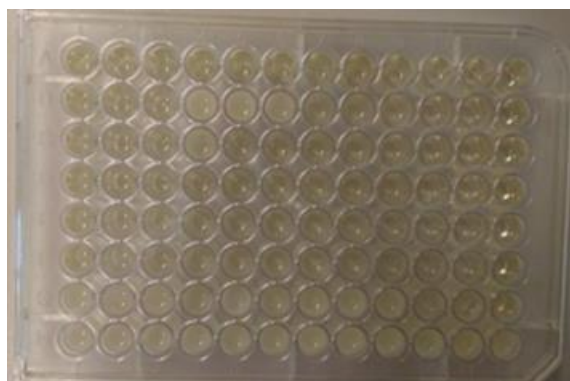
Pleťové tonikum s přidavkem extraktů ze sušeného konopí mělo přibližně srovnatelný inhibiční účinek (cca 80% nárůst kultury ve srovnání s čistou kulturou) jako micelární voda, což je způsobeno patrně velmi podobným složením těchto přípravků. Také opět nebyl prakticky vůbec žádný rozdíl v antimikrobiální aktivitě v závislosti na odrůdě ani typu konopí, jak vyplývá z následujícího grafu Obr. 38.

Inhibiční účinek zakoupeného pleťového tonika byl však znatelně vyšší (7,76 %). To by mohlo být způsobeno tím, že tento produkt oproti ostatním dvěma zakoupeným obsahuje etanol, patrně ve vyšší koncentraci (ve složení je již na druhém místě). Samotný etanol vykazuje také inhibiční účinek, což mohlo ovlivnit výsledky tohoto produktu.



Obr. 38: Antimikrobiální účinek pleťového tonika (*Propionibacterium acnes*)

Mikrotitrační destička se vzorky kosmetických přípravků je zaznamenána na následujícím obrázku Obr. 39. První dva řádky jsou jednotlivé blanky (60% etanol, čistá kultura a 0,1% allantoin), ve druhé řádce jsou pak základy kosmetických přípravků.



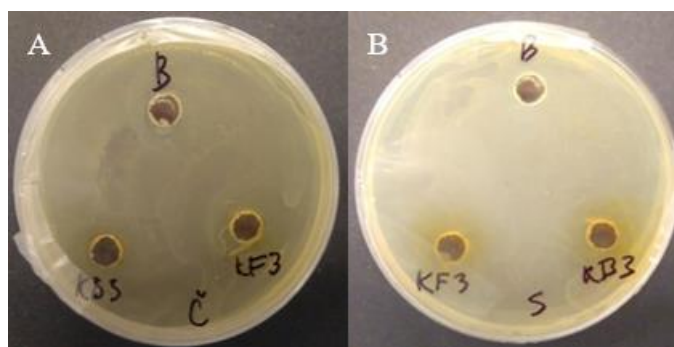
Obr. 39: Diluční jamková metoda s kosmetickými přípravky (*Propionibacterium acnes*)

### 5.6.2 Gramnegativní bakterie

Dále byl za využití diskové agarové metody zjišťován antimikrobiální účinek proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. Analyzovány byly opět extrakty z čerstvého a sušeného konopí, ale i kosmetické přípravky. Jako blanky byl opět použit 60% etanol, základy jednotlivých kosmetických přípravků a 0,1% allantoin.

Jak je patrné z následujícího obrázku Obr. 40, nejsou ani v jednom případě znatelné inhibiční zóny jednotlivých extraktů o vyšší koncentraci (A – čerstvý květ, B – sušený květ). Konopné extrakty tak nevykazují antimikrobiální aktivitu vůči gramnegativním bakteriím.

Pro kontrolu byly analyzovány i kosmetické přípravky, ale ani u nich dle očekávání nebyla pozorována žádná inhibiční zóna.

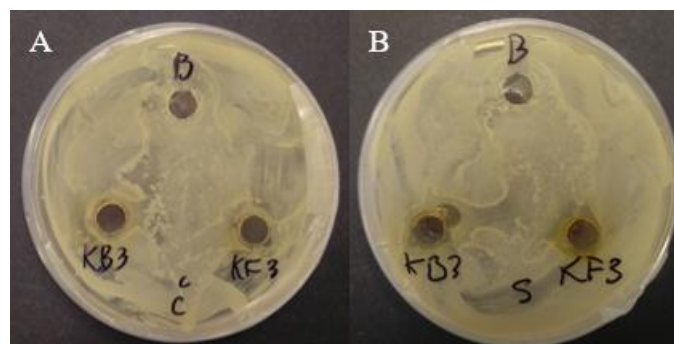


Obr. 40: Antimikrobiální aktivita extraktů (*Escherichia coli*)

### 5.6.3 Kvasinky

Jako poslední byl zjišťován antimikrobiální účinek proti kvasince *Candida glabrata* s využitím diskového agarového testu. Analyzovány byly extrakty z čerstvého a sušeného konopí, ale i kosmetické přípravky. Jako blanky byl použit 60% etanol, základy jednotlivých kosmetických přípravků a 0,1% allantoin.

Na první pohled je zřejmé, že ani proti kvasince *Candida glabrata* nemá konopný extrakt žádný účinek (viz Obr. 41). Pouze v některých případech byla po důkladnějším pozorování naměřena minimální inhibiční zóna (do 1 mm). Analyzován byl i antimikrobiální účinek kosmetických přípravků, ale tam opět nebyl žádný účinek.



Obr. 41: Antimikrobiální aktivita extraktů (*Candida glabrata*)

## 6 ZÁVĚR

Konopí patří mezi významné rostliny, jelikož se uplatňuje v mnoha sférách lidské činnosti. Nachází využití nejen v průmyslových odvětvích, ale také v oblasti kosmetické a zdravotnické péče. Tato tradiční rostlina totiž obsahuje mnoho účinných látek, které mají pozitivní vliv na lidský organismus. Mezi nejvýznamnější biologicky aktivní látky patří kanabinoidy, což jsou sloučeniny pro tuto rostlinu typické. Nejznámější je THC, jehož obsah v konopí určuje i jeho typ. Nízké procento této látky je především v konopí setém (technické konopí), ovšem to obsahuje další přínosné kanabinoidy jako je CBD, CBN a CBC. Konopí dále obsahuje terpeny, polyfenoly, vitamíny a další antioxidanty.

Díky přítomnosti mnoha účinných složek se používá při léčbě některých onemocnění. Díky antimikrobiálním účinkům se tak objevuje v řadě kosmetických přípravků určených pro aknézní pleť. Akné je multifaktoriální onemocnění mazových žláz, na jejímž průběhu se podílí například i grampozitivní bakterie *Propionibacterium acnes*. Právě proto jsou produkty s obsahem konopí tak oblíbené. Do kosmetických přípravků tak mohou být přidávány například v podobě rostlinných extraktů. Při boji s akné tak lze využít těchto přípravků, přičemž jako základ péče by měly být produkty na čištění pleti. Odstraňování přebytečného mazu a zrohovatělých buněk je totiž u akné velmi důležité. Antioxidanty a další účinné složky konopí v kosmetických přípravcích jsou však prospěšné také pro ochranu a regeneraci pleti.

Tato diplomová práce je zaměřena na technické konopí a jeho využití v kosmetice proti akné. Teoretická část obsahuje základní charakteristiku konopí a grampozitivní bakterie *Propionibacterium acnes*, se kterou se pojí akné. Toto onemocnění tak bylo podrobně popsáno zároveň s možnostmi léčby. Teorie také obsahuje přehled kosmetických přípravků, jejich složky, vehikula a stručný nástin způsobu penetrace kůží. Pro lepší porozumění mechanismu tak byla součástí i stavba kůže. Dále se tato práce v experimentální části zabývá aktivními látkami dvou odrůd technického konopí (Finola a Bialobřežské). Nejdříve byly konopné extrakty charakterizovány z hlediska účinných látek. Spektrofotometricky tak byl stanoven obsah antioxidantů (polyfenoly, flavonoidy) a výsledná antioxidační aktivita. Pro stanovení kanabinoidů byla zavedena a optimalizována nová metoda využívající kapalinovou chromatografii. Poté byly připraveny kosmetické přípravky s obsahem charakterizovaných konopných extraktů, které byly určeny pro pleť s akné. Vyrobená byla čistící řada produktů představující základ péče o tento typ pleti – pleťové mléko, micelární voda a pleťové tonikum. Na závěr tak byl zjišťován antimikrobiální účinek proti *Propionibacterium acnes*, ale i proti dalším mikroorganismům (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*).

Analyzovány byly extrakty z čerstvé a sušené rostliny. Byly použity dvě odrůdy technického konopí – Finola a Bialobřežské. Taktéž byly rozlišovány extrakty, které byly připraveny pouze z konopného květu anebo celé směsi (všech částí rostliny, tedy květu, listu, stonku a semena). Pro kontrolu byly u všech vzorků připraveny ještě navíc dvě koncentrace, tedy dvě různé navážky konopí ve 100 ml etanolu.

Z hlediska obsahu antioxidantů polyfenolů a flavonoidů a jejich antioxidační aktivity bylo dosaženo stejných závěrů. Extrakty ze sušeného konopí obsahují obecně více polyfenolů i flavonoidů, tedy i antioxidační aktivita je vyšší, což je způsobeno tím, že procesem sušení vznikají další aktivní látky. Taktéž byly sledované hodnoty lepší vždy u extraktů květů, jelikož se zde nachází účinné látky ve větším množství. Jako poslední byly získaná data srovnána v závislosti na odrůdě. V případě obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů, ale také z hlediska antioxidační aktivity vykazovala odrůda Bialobřežské lepší výsledky.

Velká část této práce se zabývá kanabinoidy, pro jejichž stanovení byla zavedena nová metoda. Vzhledem k vybavení laboratoře a z časových důvodů však nebylo dosaženo potřebných podmínek pro separaci všech analyzovaných kanabinoidů. Ve vzorcích tak byl stanoven obsah kanabinoidů CBG+CBD dohromady, dále pak zvlášť obsah CBC a CBN. Analyzovány byly pouze extrakty sušeného konopí, jelikož sledované neutrální kanabinoidy jsou přítomny až v sušené rostlině. Bylo zjištěno, že větší množství CBG+CBD se nachází v odrůdě Bialobřežské, zato obsah CBC je vyšší v odrůdě Finola. V obou případech je však vyšší koncentrace v extraktech konopného květu, což je způsobeno tím, že se zde kanabinoidy přímo tvoří, tudíž jsou zde logicky obsaženy ve větší míře.

V další části práce byly připraveny kosmetické přípravky s obsahem extraktů, pouze však ze sušeného konopí, jelikož dosahovaly lepších výsledků ve všech ohledech. Vyrobeno bylo pleťové mléko, micelární voda a pleťové tonikum. Pro srovnání byly zakoupeny konopné produkty stejného použití. Ty však obsahovaly i další bioaktivní látky jako je například allantoin. Z tohoto důvodu byla tato látka přidána i do připravené micelární vody a pleťového tonika, aby bylo možné zjistit, zda se nejedná u zakoupených přípravků o marketingový tah, tedy požadovaný účinek by nebyl zajištěn pouze konopím. Připravené kosmetické přípravky byly srovnány se zakoupenými i z hlediska obsahu antioxidantů a výsledné antioxidační aktivity. Tyto hodnoty byly však pouze přepočteny, u zakoupených produktů byly změřeny.

Na závěr byla sledována antimikrobiální aktivita všech extraktů a kosmetických přípravků. Proti grampozitivním bakteriím vykazovaly všechny extrakty znatelný inhibiční účinek. Kosmetické přípravky však na *Micrococcus luteus* prakticky nepůsobily, u *Propionibacterium acnes* však v jejich přítomnosti došlo k inhibici růstu kultury. Zakoupené kosmetické přípravky měly znatelně lepší antimikrobiální aktivitu, tedy v přípravku musí proti této bakterii působit ve velké míře i jiné složky. Extrakty ani kosmetické přípravky proti gramnegativní *Escherichia coli* neúčinkovaly vůbec, v případě kvasinky *Candida glabrata* byl výsledek prakticky stejný, přičemž minimální inhibice byla pozorována pouze u některých extraktů.

Konopí má dle dosažených výsledků své místo v kosmetickém průmyslu zcela určitě. Výhodnější je však využívat až sušenou rostlinu (květ), která obsahuje více biologicky aktivních látek. Z hlediska odrůdy si lze vybírat z mnoha vyšlechtěných druhů, které mohou být rozmanité i po obsahové stránce. Tyto kosmetické přípravky jsou vhodné nejen pro lidi, kteří mají akné, uplatnit se mohou i při léčbě jiných onemocnění.

Další práce zabývající se problematikou kosmetického využití konopí by mohla pokračovat v optimalizaci metody stanovení kanabinoidů, vhodné by bylo také zdokonalení složení a formulace kosmetických přípravků či sledovat jejich další účinky.



## 7 LITERATURA

- [1] SMALL, Ernest. Evolution and Classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The Botanical Review*. 2015, **81**(3), 189-294. DOI: 10.1007/s12229-015-9157-3. ISSN 0006-8101.
- [2] ADDLESPERGER, Elisa. Hemp. *Journal of Agricultural & Food Information*. 2015, **16**(3), 196-202. DOI: 10.1080/10496505.2015.1050323. ISSN 1049-6505.
- [3] *Konopí - biomasa pro život*. Chvaleč: Konopa, 2007, 26 s. ISBN 978-80-254-1149-0. Dostupné také z: [https://www.veci-z-konopi.cz/media/filer\\_public/16/4f/164f13b3-ca1f-4085-ba90-cc2b66a5481a/konopi\\_pro\\_zivot\\_sestava\\_final.pdf](https://www.veci-z-konopi.cz/media/filer_public/16/4f/164f13b3-ca1f-4085-ba90-cc2b66a5481a/konopi_pro_zivot_sestava_final.pdf)
- [4] FIŠAR, Zdeněk. Phytocannabinoids and Endocannabinoids. *Current Drug Abuse Reviewse*. 2009, **2**(1), 51-75. DOI: 10.2174/1874473710902010051. ISSN 18744737.
- [5] WEST, David P. *Hemp and Marijuana: Myths & Realities*. North American Industrial Hemp Council, ©1998. Dostupné také z: [http://votehemp.com/PDF/myths\\_facts.pdf](http://votehemp.com/PDF/myths_facts.pdf)
- [6] Zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů. In: *Sbírka zákonů*. 11. 6. 1998. ISSN 1211-1244.
- [7] *Cannabis sativa l. - botany and biotechnology*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017. ISBN 978-3-319-54563-9.
- [8] RUMAN, Michal. *Cannabis - konopí: průvodce světem univerzální rostliny*. Praha: Malý princ, 2014. ISBN 978-80-87754-13-9.
- [9] Úřední věstník Evropské unie, CA 402. In: české vydání, 2012, svazek 55. ISSN 1977-0863. 10.3000/19770863.CA2012.402.ces. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2012:402A:FULL&from=CS>
- [10] Odrůdy konopí. *KonopAr* [online]. ©2017 [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <https://trompetol.wixsite.com/konopar/kopie-osivo-konopi>
- [11] BJELKOVÁ, Marie. Vybrané vlastnosti odrůd konopí setého. *TRAWA* [online]. Mníšek pod Brdy: TRAWA z.s, 2014 [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: [http://trawa.cz/wp-content/uploads/2015/04/23-konopi\\_sete.pdf](http://trawa.cz/wp-content/uploads/2015/04/23-konopi_sete.pdf)
- [12] KUDDUS, Mohammed, Ibrahim GINAWI a Awdah ALHAZIMI. Cannabis sativa: An ancient wild edible plant of India. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2013, **25**(10), 736-. DOI: 10.9755/ejfa.v25i10.16400. ISSN 2079-052x.
- [13] FLORES-SANCHEZ, Isvett Josefina a Robert VERPOORTE. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*. 2008, **7**(3), 615-639. DOI: 10.1007/s11101-008-9094-4. ISSN 1568-7767.
- [14] RUSSO, Ethan B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 2011, **163**(7), 1344-1364. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x. ISSN 00071188.

- [15] ROSENBERG, Evan C., Richard W. TSIEN, Benjamin J. WHALLEY a Orrin DEVINSKY. Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2015, **12**(4), 747-768. DOI: 10.1007/s13311-015-0375-5. ISSN 1933-7213.
- [16] ANDRE, Christelle M., Jean-Francois HAUSMAN a Gea GUERRIERO. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*. 2016, **7**(19). DOI: 10.3389/fpls.2016.00019. ISSN 1664-462x.
- [17] DE PETROCELLIS, Luciano a Vincenzo DI MARZO. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009, **23**(1), 1-15. DOI: 10.1016/j.beem.2008.10.013. ISSN 1521-690x.
- [18] IZZO, Angelo A., Francesca BORRELLI, Raffaele CAPASSO, Vincenzo DI MARZO a Raphael MECHOULAM. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009, **30**(10), 515-527. DOI: 10.1016/j.tips.2009.07.006. ISSN 0165-6147.
- [19] INGRAO, Carlo et al. Energy and environmental assessment of industrial hemp for building applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, **51**, 29-42. DOI: 10.1016/j.rser.2015.06.002. ISSN 13640321.
- [20] RANALLI, Paolo a Gianpietro VENTURI. Hemp as a raw material for industrial applications. *Euphytica*. 2004, **140**(1-2), 1-6. DOI: 10.1007/s10681-004-4749-8. ISSN 0014-2336.
- [21] FORTENBERY, T. Randall a Michael BENNETT. Opportunities for Commercial Hemp Production. *Review of Agricultural Economics*. 2004, **26**(1), 97-117. DOI: 10.1111/j.1467-9353.2003.00164.x. ISSN 1058-7195.
- [22] HAZEKAMP, Arno, Mark A. WARE, Kirsten R. MULLER-VAHL, Donald ABRAMS a Franjo GROTENHERMEN. The Medicinal Use of Cannabis and Cannabinoids—An International Cross-Sectional Survey on Administration Forms. *Journal of Psychoactive Drugs*. 2013, **45**(3), 199–210. DOI: 10.1080/02791072.2013.805976. ISSN 0279-1072.
- [23] PERRY, Alexandra a Peter LAMBERT. Propionibacterium acnes: infection beyond the skin. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014, **9**(12), 1149-1156. DOI: 10.1586/eri.11.137. ISSN 1478-7210.
- [24] PERRY, A. L. a P. A. LAMBERT. Propionibacterium acnes. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, **42**(3), 185-188. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01866.x. ISSN 0266-8254.
- [25] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 978-802-3802-979.
- [26] PROPIONIBACTERIUM. *Hardy Diagnostics: A Culture of Service* [online]. West McCoy Lane, Santa Maria, CA: Hardy Diagnostics, ©2018 [cit. 2018-02-13]. Dostupné z: [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/Propionibacterium.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Propionibacterium.htm)

- [27] OMER, Hélène, Andrew MCDOWELL a Oleg A. ALEXEYEV. Understanding the role of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris: The critical importance of skin sampling methodologies. *Clinics in Dermatology*. 2017, **35**(2), 118-129. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2016.10.003. ISSN 0738081x.
- [28] ABATE, Miseker E. Shedding New Light on Acne: The Effects of Photodynamic Therapy on *Propionibacterium acnes*. *Inquiries Journal/Student Pulse* [online]. 2013, **5**(9), 1-4 [cit. 2018-02-10]. ISSN 2153-5760. Dostupné z: <http://www.inquiriesjournal.com/articles/763/shedding-new-light-on-acne-the-effects-of-photodynamic-therapy-on-propionibacterium-acnes>
- [29] SUBHRAVETI, Pallavi et al. *Propionibacterium acnes* HL067PA1 Pathways. *BioCyc Database Collection* [online]. 333 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA: SRI International, ©2016 [cit. 2018-02-13]. Dostupné z: <https://biocyc.org/PACN765110-HMP/class-tree?object=Pathways>
- [30] VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, **71**(3), 495-548. DOI: 10.1128/MMBR.00005-07. ISSN 1092-2172.
- [31] FALCOCCHIO, Serena et al. *Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006, **40**(3-4), 132-137. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.02.011. ISSN 13811177.
- [32] JAEGER, Karl-Erich, Stéphane RANSAC, Bauke W. DIJKSTRA, Charles COLSON, Margreet HEUVEL a Onno MISSET. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994, **15**(1), 29-63. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x. ISSN 01686445.
- [33] STEHR, F., M. KRETSCHMAR, C. KRÖGER, B. HUBE a W. SCHÄFER. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003, **22**(5-6), 347-355. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00049-3. ISSN 1381-1177.
- [34] ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-802-4629-322.
- [35] RULCOVÁ, Jarmila. *Akné: příčiny, projevy a terapeutické možnosti: rady lékaře*. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-725-4661-9.
- [36] NASRI, Hamid et al. Medicinal Plants for the Treatment of Acne Vulgaris: A Review of Recent Evidences. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015, **8**(11), -. DOI: 10.5812/jjm.25580. ISSN 2008-3645.
- [37] PICARDO, Mauro, Monica OTTAVIANI, Emanuela CAMERA a Arianna MASTROFRANCESCO. Sebaceous gland lipids. *Dermato-Endocrinology*. 2009, **1**(2), 68-71. DOI: 10.4161/derm.1.2.8472. ISSN 1938-1980.
- [38] HOLLAND, Keith T. a Richard A. BOJAR. Cosmetics: What is Their Influence on the Skin Microflora? *American Journal of Clinical Dermatology*. 2002, **3**(7), 445-449. DOI: 10.2165/00128071-200203070-00001. ISSN 1175-0561.

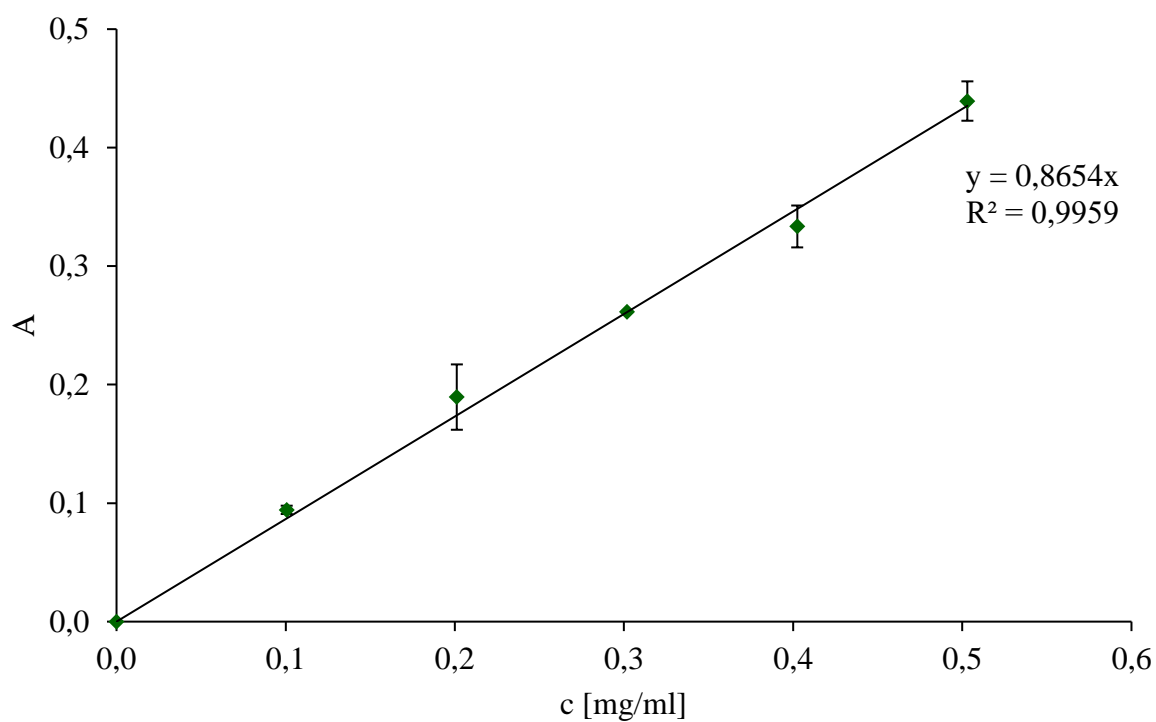
- [39] *Anatomy & Physiology* [online]. OpenStax College, 2013 [cit. 2018-01-10]. ISBN 978-1-938168-13-0. Dostupné z: <http://cnx.org/content/col11496/latest/>
- [40] DECKER, A. a E. GRABER. Over the counter Acne Treatments: A Review. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2012, **5**(5), 32-40. ISSN 1941-2789. Dostupné také z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366450/pdf/jcad\\_5\\_5\\_32.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366450/pdf/jcad_5_5_32.pdf)
- [41] FOX, Lizelle et al. Treatment Modalities for Acne. *Molecules*. 2016, **21**(12), 1063-. DOI: 10.3390/molecules21081063. ISSN 1420-3049.
- [42] RULCOVÁ, Jarmila. Současné přístupy k léčbě acne vulgaris. *Remedia*. 2015, **25**(1), 27-32. ISSN 0862-8947.
- [43] CHULAROJANAMONTRI, Leena et al. Moisturizers for Acne: What are their Constituents?. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2014, **7**(5), 36-44. ISSN 1941-2789. Dostupné také z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025519/pdf/jcad\\_7\\_5\\_36.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025519/pdf/jcad_7_5_36.pdf)
- [44] DRÉNO, B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2017, **31**(5), 8-12. DOI: 10.1111/jdv.14374. ISSN 09269959.
- [45] VOGL, C.R. et al. Hemp (*Cannabis sativa* L.) as a Resource for Green Cosmetics. *Journal of Industrial Hemp*. 2004, **9**(1), 51-68. DOI: 10.1300/J237v09n01\_06. ISSN 1537-7881.
- [46] KOLARSICK, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011, **3**(4), 203-213. DOI: 10.1097/JDN.0b013e3182274a98. ISSN 1945-760x.
- [47] FERTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a praxi*. Praha: Maxdorf, 1994, 269 s., 4 s. obr. příl. ISBN 80-858-0020-9.
- [48] DRAELOS, Zoe Diana. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-140-5186-353.
- [49] SURBER, Christian a Jan KOTTNER. Skin care products: What do they promise, what do they deliver. *Journal of Tissue Viability*. 2017, **26**(1), 29-36. DOI: 10.1016/j.jtv.2016.03.006. ISSN 0965206X.
- [50] BAKI, Gabriella a Kenneth S. ALEXANDER. *Introduction to cosmetic formulation and technology*. New Jersey: John Wiley, 2015. ISBN 978-1118763780.
- [51] FATIMA, Amreen et al. Benefits of herbal extracts in cosmetics: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013, **4**(10), 3746-3760. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232. ISSN 2320-5148.
- [52] ROSEN, Meyer R. *Delivery system handbook for personal care and cosmetic products: Technology, applications, and formulations*. Norwich, NY: William Andrew Pub., c2005. ISBN 08-155-1504-9.
- [53] BAREL, A. O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. Fourth edition. Boca Raton: CRC Press, 2014. ISBN 978-184-2145-647.

- [54] Cosmetic Products Notification Portal (CPNP): Uživatelská příručka podle článku 13. *Krajská hygienická stanice Královéhradeckého kraje se sídlem v Hradci Králové* [online]. Hradec Králové: Krajská hygienická stanice Královéhradeckého kraje se sídlem v Hradci Králové, ©2016, 1. 6. 2013 [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: [http://www.khshk.cz/khsdata/formulare/pbu/cpnp\\_uzivatelsky\\_manual\\_cz.pdf](http://www.khshk.cz/khsdata/formulare/pbu/cpnp_uzivatelsky_manual_cz.pdf)
- [55] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1987.
- [56] ČSN 6815: Kosmetika, vonné kompozice. *Zákony.cz* [online]. Frýdek-Místek: Heagl, 2018 [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <http://www.zakony.cz/normy/vyrobky-chemickeho-prumyslu/normy-kosmetika-vonne-kompozice-6815>
- [57] *Vyhláška, kterou se stanoví analytické metody kontroly složení kosmetických prostředků*. In: Sbírka zákonů, 2005, ročník 2005, částka 172, číslo 494. ISSN 1211-1244. Dostupné také z: <http://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=494&r=2005>
- [58] TANG, Xuan et al. Antimicrobial activity and preliminary mode of action of PlnEF expressed in *Escherichia coli* against *Staphylococci*. *Protein Expression and Purification*. 2018, **143**, 28-33. DOI: 10.1016/j.pep.2017.10.008. ISSN 1046-5928.
- [59] MOHD ZAINOL, M. K., A. ABDUL-HAMID, F. ABU BAKAR a S. PAK DEK. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*. 2009, **16**(4), 531-537. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/270512422\\_Effect\\_of\\_different\\_drying\\_methods\\_on\\_the\\_degradation\\_of\\_selected\\_flavonoids\\_in\\_Centella\\_asiatica](https://www.researchgate.net/publication/270512422_Effect_of_different_drying_methods_on_the_degradation_of_selected_flavonoids_in_Centella_asiatica)
- [60] RATZ-LYKO, Anna, Jacek ARCT a Katarzyna PYTKOWSKA. Methods for evaluation of cosmetic antioxidant capacity. *Skin Research and Technology*. 2012, **18**(4), 421-430. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2011.00588.x. ISSN 0909752X.
- [61] REUTE, W. M. Analysis of Cannabinoids in Cannabis by UHPLC Using PDA Detection. *PerkinElmer* [online]. Shelton, CT: PerkinElmer, ©1998-2018, [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: [http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP\\_Analysis\\_of\\_Cannabinoids\\_Application\\_Note\\_013261B\\_01.pdf](http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_Analysis_of_Cannabinoids_Application_Note_013261B_01.pdf)
- [62] DE BACKER, Benjamin et al. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B*. 2009, **877**(32), 4115-4124. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.11.004. ISSN 15700232.
- [63] LAYNE, Jeff, LOMAS, Simon a Scott KREPICH. 12 Cannabinoids by HPLC-UV using Kinetex 2.6  $\mu$ m C18 Core-Shell Column. *Phenomenex: breaking with tradition* [online]. Torrance, CA: Phenomenex, ©2018 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/ViewDocument/?id=12+cannabinoids+by+hplc-uv+using+kinetex+2.6+%u03bcm+c18+core-shell+column>
- [64] PATEL, B. et al. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **146**, 15-23. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.07.021. ISSN 07317085.

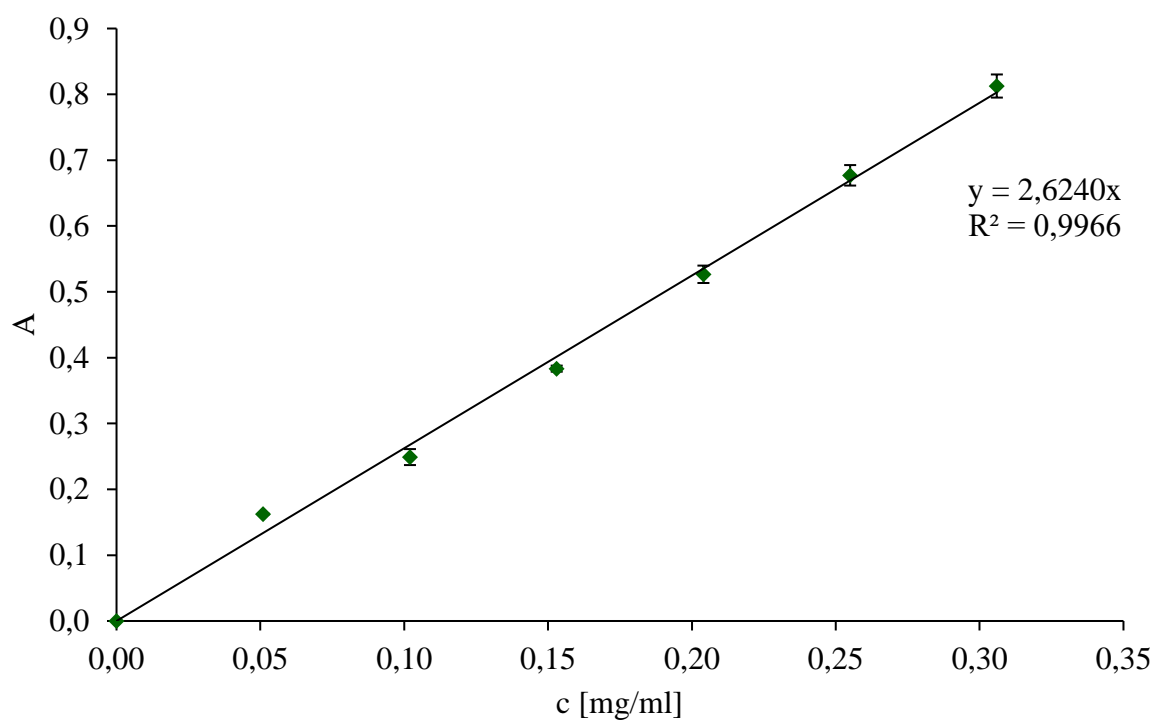
## 8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)
BHI	Brain Heart Infusion (médium)
CBC	Kanabichromen
CBD	Kanabidiol
CBG	Kanabigerol
CBGA	kyselina kanabigerolová
CBN	Kanabinol
CCM	Czech Collection of Microorganisms (česká sbírka mikroorganismů)
Da	Dalton (jednotka)
FPP	farnesyl pyrofosfát
GehA	glycerol-ester hydroláza A
GPP	geranyl pyrofosfát
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPP	isopentenyl difosfát
LB	Luria-Bertani (médium)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NB	Nutrient Broth (médium)
OLA	kyselina olivetová
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
THC	$\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol
UV	záření v ultrafialové oblasti spektra
VIS	záření ve viditelné oblasti spektra
YPD	Yeast Peptone Dextrose (médium)
$\lambda$	lambda (vlnová délka)
§	paragraf
A	absorbance
A <sub>0</sub>	počáteční absorbance
A <sub>1</sub>	absorbance po uplynutí 10-ti minut

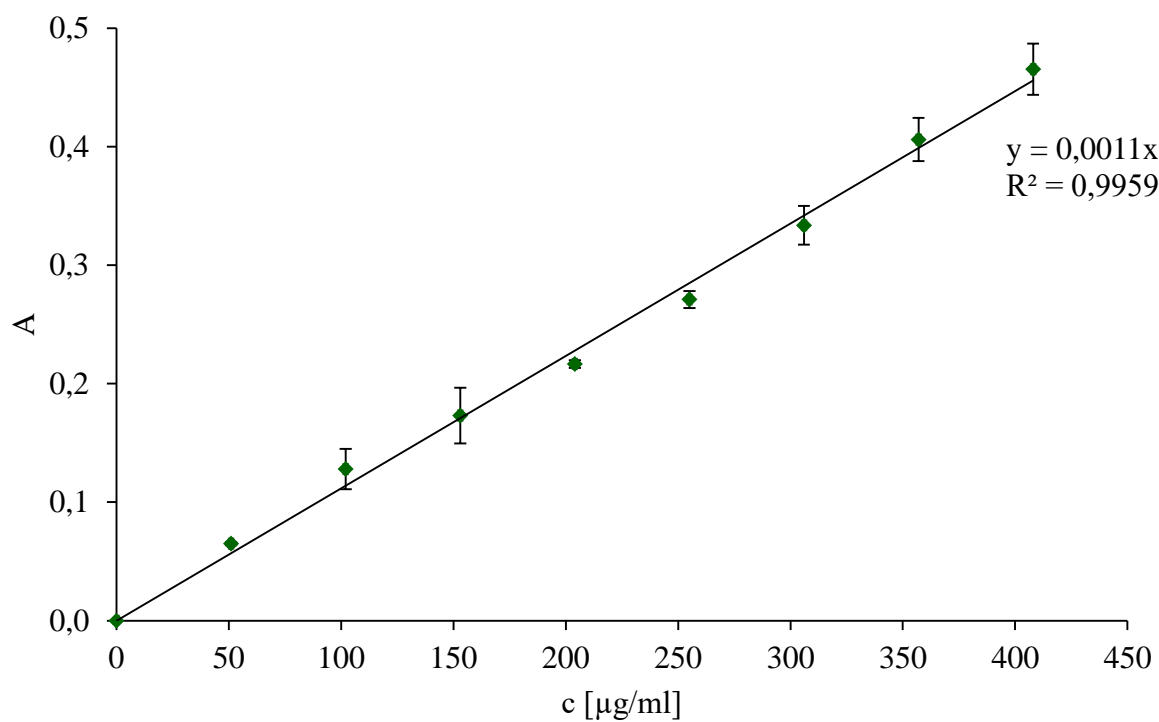
## 9 PŘÍLOHY



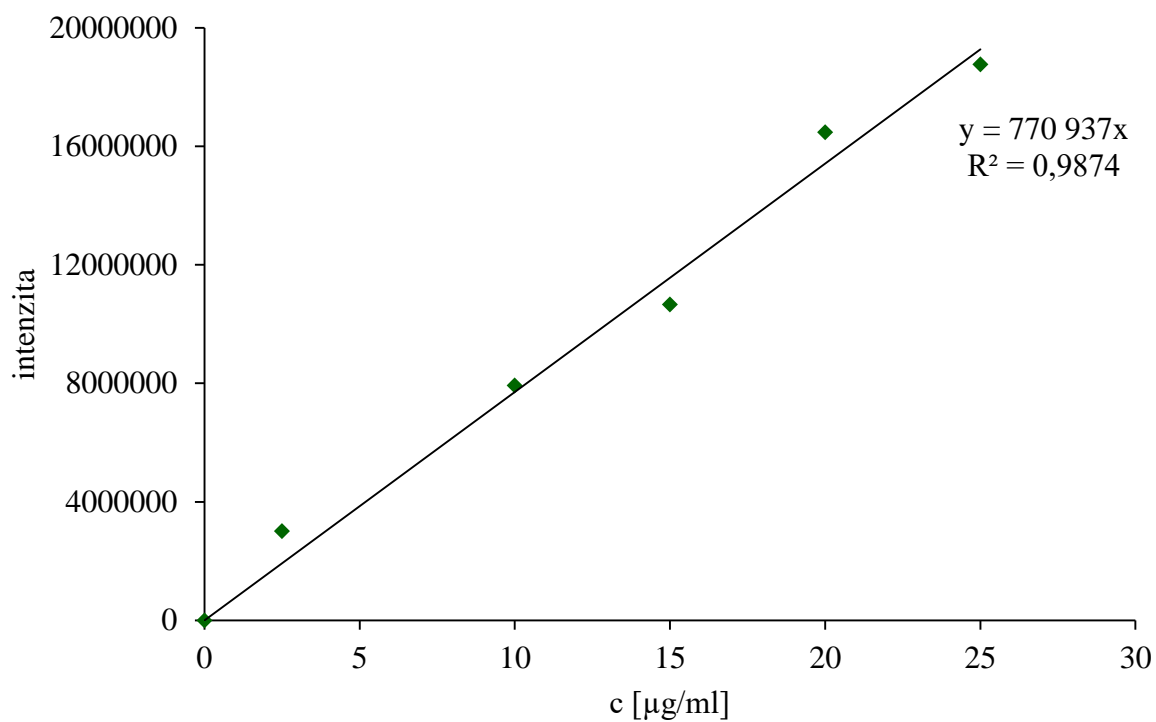
*Příloha 1: Kalibrační závislost celkových polyfenolů*



*Příloha 2: Kalibrační závislost celkových flavonoidů*

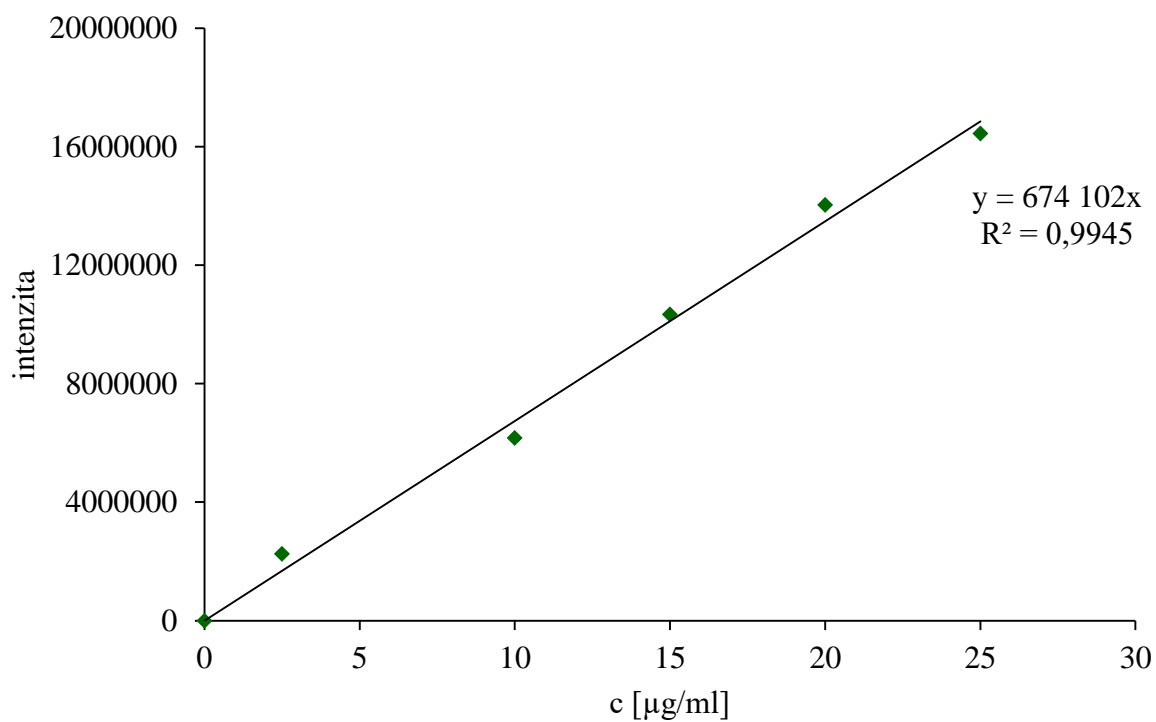


*Příloha 3: Kalibrační závislost antioxidační aktivity*

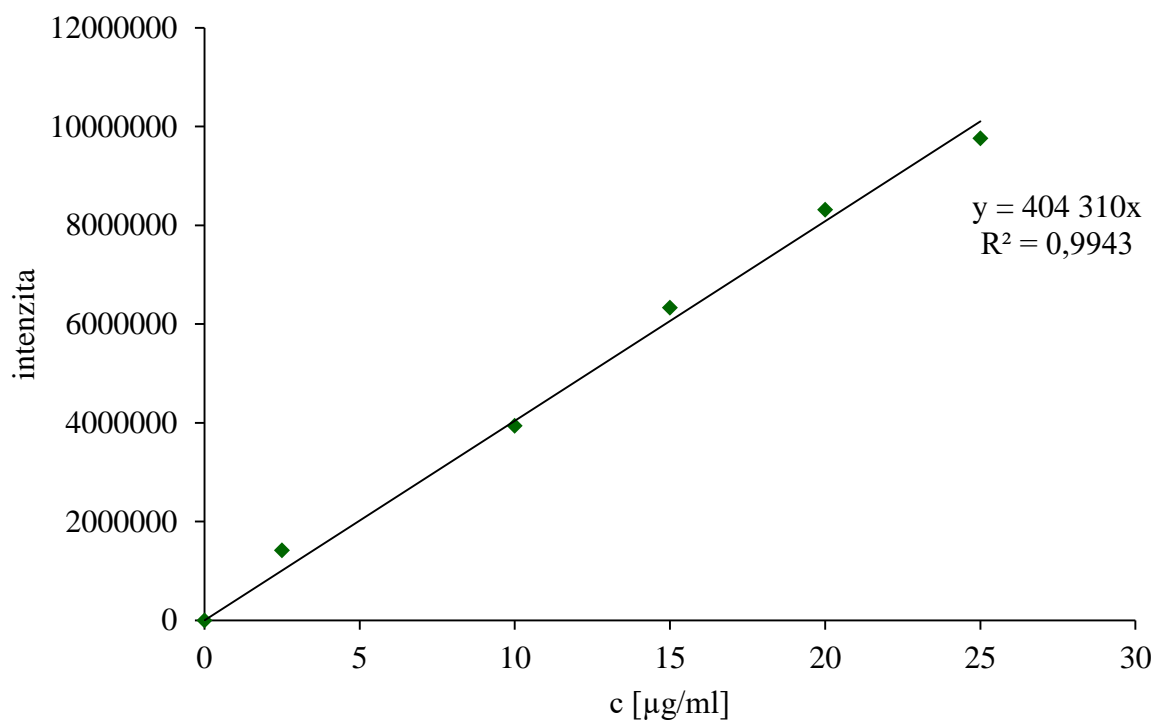


*Příloha 4: Kalibrační závislost CBG+CBD*





*Příloha 5: Kalibrační závislost CBN*



*Příloha 6: Kalibrační závislost CBC*